



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA – UNIR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL -
PGBIOEXP

ALCIONE DE OLIVEIRA DOS SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO DE HEPATITE B OCULTA EM INDIVÍDUOS COM ANTI-
HBc ISOLADO UTILIZANDO UM MÉTODO MOLECULAR
ULTRASSENSÍVEL.**

Porto Velho-RO
2016.

ALCIONE DE OLIVEIRA DOS SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO DE HEPATITE B OCULTA EM INDIVÍDUOS COM
ANTI-HBc ISOLADO UTILIZANDO UM MÉTODO MOLECULAR
ULTRASSENSÍVEL.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental – PGBIOEXP – do Núcleo de Saúde da Universidade Federal de Rondônia para obtenção do título de doutora.

Orientador: Dr. Juan Miguel Villalobos Salcedo.

Co-orientadora: Dra. Deusilene Souza Vieira.

Porto Velho-RO

2016.

ALCIONE DE OLIVEIRA DOS SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO DE HEPATITE B OCULTA EM INDIVÍDUOS COM
ANTI-HBc ISOLADO, UTILIZANDO UM MÉTODO MOLECULAR
ULTRASSENSÍVEL.**

Defesa de tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental – PGBIOEXP – do Núcleo de Saúde da Universidade Federal de Rondônia para obtenção do título de doutora.

Banca examinadora

Dr. Juan Miguel Villalobos Salcedo
Presidente

Dra^a Luciana Gatto Brito
Examinador 1

Dra^a Giselle Martins Gonçalves
Examinador 2

Dra. Deusilene Souza Vieira
Examinador 3

Dedico esta tese em especial aos meus filhos, meu marido e aos meus pais. Sem
vocês essa conquista não seria tão gratificante.
Obrigada por tanta inspiração!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por todos acontecimentos que já vivi, bons e ruins, todos com grande aprendizado.

Aos meus pais, Afonso e Audeneide, pois foram as primeiras pessoas a me ensinarem a valorizar os estudos e lutar por uma vida melhor. Obrigada pelo exemplo de coragem, superação e pelo apoio incondicional sempre.

Aos meus filhos, Marcos Afonso e Letícia, razão da minha vida, obrigada por todos os momentos de convivência, por me permitirem sentir um amor tão sublime e infinito. Nos momentos de tristezas e dificuldades vocês são o principal motivo de coragem, esperança e alegria; com vocês sou forte, persistente e jamais vou desistir. Tudo por vocês, para vocês e de vocês!

Ao meu marido, Marcos Miranda, meu cúmplice, sempre presente e ajudando em qualquer situação. Começamos a construir juntos, sem dúvidas nossa melhor obra é nossa família. Amor absoluto sempre!

Ao meu orientador Dr. Juan Miguel V. Salcedo, pela oportunidade e confiança. Serei eternamente grata por todos os ensinamentos, pela orientação e atenção ao longo desses anos. É uma grande honra ser sua aluna!

A minha co-orientadora, Dra. Deusilene Souza Vieira, pessoa muito especial em minha vida, quem me acolheu na vida acadêmica, acreditou e me mostrou o caminho do crescimento. Não foi nada fácil, mas te agradeço por tudo, pela orientação, apoio, por ter me estimulado a estudar e aprender cada vez mais, sobretudo pela amizade que construímos.

Agradeço sempre quem desde o início me abriu as portas, meu orientador na iniciação científica Dr. Paulo Afonso Nogueira, por ter aberto as portas da pesquisa e da vida científica. Agradeço ao Dr. Rodrigo G. Stábili, pela ajuda, apoio e incentivo na minha iniciação científica. Ao meu orientador no mestrado, Dr. Eduardo Honda pela contribuição no meu crescimento profissional.

A equipe do Laboratório de Virologia, a todos os alunos de iniciação científica e de mestrado e doutorado, em especial ao Luan Botelho, pela amizade, apoio e companheirismo nos projetos e artigos.

Aos meus amigos, pelo apoio e compreensão. Mesmo não podendo estar sempre juntos, sei que posso contar em qualquer circunstância.

Aos membros da banca pelo interesse e disponibilidade.

A todos que de alguma forma contribuíram para minha formação acadêmica e participaram direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho, meus agradecimentos.

RESUMO

Atualmente existe um risco significativo de transmissão do vírus da hepatite B (HBV) durante a transfusão de sangue e transplante de órgãos, em áreas endêmicas para essa infecção. Isso ocorre em duas situações em especial, a primeira pode acontecer na fase aguda, onde há um período de janela imunológica, quando o marcador sorológico HBsAg pode ser indetectável no soro. A outra situação, durante a fase crônica, na chamada infecção oculta, definida como a presença de DNA-HBV em indivíduos com teste para HBsAg negativo e geralmente com carga viral muito baixa. A hepatite B oculta é comum em indivíduos que apresentam apenas, o marcador sorológico anti-HBc total reagente, perfil definido como anti-HBc total isolado. A redução do risco de transmissão nessas situações depende da aplicação de testes mais sensíveis. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi identificar a hepatite B oculta em amostras de indivíduos com anti-HBc total isolado, utilizando um método de PCR em tempo real *in house* ultrasensível (qHBV), servindo como alternativa para teste de ácido nucleico (NAT). Para isso, os valores ensaio foram calibrados com o 1º padrão internacional estabelecido pela OMS (*OptiQuant® DNA-HBV Quantificação Pannel, AcroMetrix Europe B.V.*). Além disso, foram realizados testes para avaliar a sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. O limite de detecção para o qHBV calibrados com o OptiQuant foi de 2000/mL num volume total de reação de 30 µl. Foi observada uma forte correlação entre os dois métodos ($r^2 = 0,9965$ e $p < 0,0001$). A linha de regressão dá-nos a seguinte equação: $\text{Log } 10 (\text{UI} / \text{mL}) = 0,9038 \text{Log } 10 (\text{cópias} / \text{mL}) - 1,0643$, sugerindo que $1 \text{ UI} / \text{mL} = 15 \text{ cópias} / \text{mL}$. O método foi considerado sensível para identificação de hepatite B oculta, onde de 150 indivíduos com anti-HBc isolado, 42 foram positivas para DNA-HBV. Portanto, podemos afirmar que o qHBV pode detectar carga viral em indivíduos com hepatite B em qualquer estágio da doença, com alta capacidade para o rastreio de NAT para hepatite B em doadores de sangue e de órgãos. A sensibilidade deste método poderia proporcionar um avanço para a automação em bancos de sangue, centros de hemodiálise e em transplantes de órgãos, aumentando a segurança dos pacientes receptores.

Palavras chaves: hepatite B; infecção oculta; anti-HBc isolado

ABSTRACT

Currently there is a significant risk of transmission of hepatitis B virus (HBV) during blood transfusion and organ transplantation in endemic areas for this infection. This occurs in two situations especially, the first one occur in the acute phase, during the immunological window period, when the serologic marker may be undetectable HBsAg in serum. The other situation occurs in the chronic phase, called hidden infection, defined as the presence of HBV DNA in individuals with negative test for HBsAg and usually with very low viral load. The hidden B Hepatitis is common in people who have only serologic anti-HBc reagent marker profile defined as anti-HBc isolated. The reduction of the risk of transmission in these situations depends on the application of more sensitive tests. Thus, the aim of this study was to identify hepatitis B hidden in samples of subjects with anti-HBc isolated using a in house ultrasensitive method of real-time PCR (qHBV), serving as an alternative to nucleic acid test (NAT). For this, the test values were calibrated with the international standard set by the WHO 1 (OptiQuant® DNA-HBV Quantification Panel, AcroMetrix Europe B.V.). Additionally, tests were conducted to assess the sensitivity, specificity and reproducibility. The detection limit for qHBV calibrated with OptiQuanti was 2000 / mL in a total volume of 30 uL reaction. a strong correlation between the two methods ($R^2 = 0.9965$; $p < 0.0001$) was observed. The regression line gives us the following equation: $\text{Log } 10 (\text{IU} / \text{mL}) = 10.09038 \text{Log} (\text{copies} / \text{mL}) - 1.0643$, suggesting that $1 \text{ IU} / \text{mL} = 15 \text{ copies} / \text{mL}$. The method was considered sensitive to occult hepatitis B identification, where 150 patients with anti-HBc isolated, 42 were positive for HBV-DNA. Therefore, we can say that qHBV can detect viral load in individuals with hepatitis B at any stage of the disease, with high capacity for NAT screening for hepatitis B in blood donors and organ. The sensitivity of this method could provide a breakthrough for automation in blood banks, dialysis centers and organ transplantation, increasing the safety of patients receiving.

Key words: hepatitis B; occult infection; anti-HBc isolated

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	alanina aminotransferase ou alanina transaminase
Anti-HBc	Anticorpo contra proteína do <i>core</i> do HBV
Anti-HBe	Anticorpo contra proteína <i>e</i> do HBV
Anti-HBs	anticorpo contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B
AST	aspartato aminotransferase
cccDNA	DNA circular covalentemente fechado (do inglês <i>circular covalently closed DNA</i>)
ELISA	ensaio imunossorvente ligado à enzima (do inglês <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
HBcAg	antígeno core do vírus da hepatite B
HBeAg	antígeno “e” do vírus da hepatite B
HBsAg	antígeno de superfície do vírus da hepatite B ou antígeno “s” do vírus da hepatite B
HBV	vírus da hepatite B (do inglês <i>hepatitis B virus</i>)
HCV	vírus da hepatite C (do inglês <i>hepatitis C virus</i>)
HDV	vírus da hepatite D (do inglês <i>hepatitis D virus</i>)
IgG	imunoglobulinas da classe G
IgM	imunoglobulinas da classe M
kb	kilobases
OBI	Infecção oculta pelo HBV
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	fase de leitura aberta (do inglês <i>open reading frame</i>)
PCR	reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>polymerase chain reaction</i>)
TGO	transaminase glutâmico oxalacética
TGP	transaminase glutâmico pirúvica

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Distribuição mundial da infecção crônica pela HBV.	13
Figura 2- Estrutura do HBV.	15
Figura 3- Organização genômica do HBV	15
Figura 4- Ciclo de replicação do HBV.	20
Figura 5- Curso sorológico típico de uma infecção aguda pelo HBV.	22
Figura 6- Representação sorológica de infecção aguda pelo HBV.	24
Figura 7- Diagnóstico para hepatite B..	29
Figura 8- Curva de regressão linear do método qHBV.....	40
Figura 9- Regressão linear do primeiro padrão preconizado pela OM.....	42
Figura 10- A sensibilidade analítica de qHBV	42
Figura 11- Especificidade analítica.....	43
Figura 12- Triagem das amostras com anti-HBc isolado por PCR em tempo real.....	44
Figura 13- Frequência de infecção oculta em amostras com anti-HBc isolado.	45
Figura 14- Quantificação do DNA-HBV	45
Figura 15- Análise da frequência relativa em relação ao sexo.....	46
Figura 16- Análise do perfil bioquímico das amostras com infecção oculta..	46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. BREVE HISTÓRICO.....	12
1.2 EPIDEMIOLOGIA DO HBV	12
1.2.1 Mundial	12
1.2.2 No Brasil	13
1.2.3 Em Rondônia	14
1.3 VÍRUS DA HEPATITE B.....	14
1.3.1 Genoma do HBV.....	15
1.3.2 Genótipos do HBV	16
1.3.3 Replicação do HBV.....	18
1.3.4 Vírus mutante	21
1.4 QUADRO CLÍNICO DA HEPATITE B	21
1.4.1 Infecção aguda do HBV	22
1.4.2 Infecção crônica do HBV	23
1.4.3 Infecção oculta	23
1.5 TRANSMISSÃO DO HBV.....	25
1.6 DIAGNOSTICO LABORATORIAL DA HEPATITE B	25
1.6.1 Diagnóstico inespecífico	25
1.6.2 Marcadores sorológicos do HBV.....	26
1.6.3 Marcadores virológicos	28
1.7 RESPOSTA IMUNOLÓGICA AO HBV	29
1.8 TRATAMENTO DA HEPATITE B	30
1.9 PROFILAXIA DA HEPATITE B	32
2 JUSTIFICATIVA	33
3 OBJETIVOS	34
3.1 OBJETIVO GERAL.....	34
3.2 ESPECÍFICOS	34
4 METODOLOGIA.....	35
4.1 LOCAL DO ESTUDO	35
4.2 AMOSTRA ESTUDADA	35
4.3 COLETA DE AMOSTRA BIOLÓGICA	36
4.4 EXTRAÇÃO DO DNA VIRAL.....	36
4.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DO DNA-HBV	37
4.5.1 Ensaio <i>In House</i>	37
4.5.2 Real Time PCR Ultrassensível.....	37
4.5.3 Ensaios Intra e Inter-Experimentais.....	38
4.5.4 Valores HBV-DNA cópias/mL e UI / mL	38
4.5.5 Painel de Quantificação	38
4.5.6 Análise Estatística.....	38
4.5.7 Especificidade analítica.....	38
4.5.8 Sensibilidade analítica.....	39
4.6 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA-HBV EM AMOSTRAS DE INDIVÍDUOS ANTI-HBC ISOLADO.	39
4.7 PERFIL DOS PORTADORES DE INFECÇÃO OCULTA.	39
4.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	39
5 RESULTADOS	40
5.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO <i>IN HOUSE</i>	40
5.1.1 Eficiência e Sensibilidade analítica	40
5.1.2 Ensaio de Reprodutibilidade	41
5.1.3 Validação do método qHBV	42

5.1.4 Especificidade analítica e desempenho da detecção de amostras indeterminadas	43
5.2 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA-HBV EM AMOSTRAS DE INDIVÍDUOS ANTI-HBC ISOLADO.	44
5.2.1 Triagem do DNA-HBV por PCR em tempo real	44
5.2.2 Quantificação da carga viral do HBV	45
5.3 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL CLÍNICO E IDENTIFICAÇÃO DE COINFECCÕES.....	46
5.3.1 Caracterização do perfil clínico.....	46
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÃO.....	53
8 REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

1.1. BREVE HISTÓRICO

O termo hepatite é usado para definir um processo inflamatório no fígado, apresentando diversos fatores como causa, dos quais os vírus hepatotrópicos são frequentes agentes etiológicos dessa patologia. As hepatites virais são doenças infecciosas causadas por diferentes vírus. Dentre eles está classificado o vírus da hepatite B (HBV). Hipócrates ao descrever uma epidemia ictérica, foi sem dúvida, referindo-se a infecções pelo HBV e a outros agentes capazes de infectar o fígado (MAHONEY, 1999).

O nome hepatite B foi introduzido por MacCallum em 1947, para definir uma hepatite de transmissão parenteral, soro-homóloga, sérica e de longo período de incubação (HOLLINGER, 1994; FONSECA, 2010). Em 1963, um geneticista americano chamado Baruch Blumberg e colaboradores, identificaram no soro pertencente a um aborígine australiano a presença de um antígeno que reagia como o soro de dois doentes hemofílicos politransfundidos. A princípio imaginou-se que seriam polimorfos de lipoproteínas séricas molécula alvo do estudo, porém devido à grande quantidade foi observado que se tratava de uma estrutura diferente. Assim o antígeno encontrado foi identificado pelos pesquisadores como Antígeno Austrália (AgAu), devido a origem da amostra do paciente e publicado no “*Journal of the American Medical Association (JAMA)*” em 1965, com o título “*A New antigen in Leukemia sera*” (BLUMBERG et al., 1965). Em 1968, o AgAu foi associado com a hepatite B, sendo denominado antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) (PRINCE, 1968), termo utilizado até hoje.

1.2 EPIDEMIOLOGIA DO HBV

1.2.1 Mundial

A infecção crônica causada pelo HBV é um grave problema de saúde pública, estima-se que aproximadamente 350 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas com HBV e em risco de desenvolvimento de hepatocarcinoma celular e cirrose (WHO, 2015; SILVA et al., 2015). A endemicidade da infecção pelo HBV é considerada alta onde a prevalência do HBsAg é superior a 8%, ou onde 60% ou mais da população possui sorologia de infecção prévia pelo HBV (anti-HBc total reagente). Isso ocorre principalmente em locais como África, parte da América do Sul, Sudeste da Ásia, China, partes do Oriente Médio e ilhas do Pacífico (KRAMVIS et al., 2002;

BARTHOLOMEUSZ; SCHAEFER, 2004; WEBER, 2005; KIM et al., 2011). Onde a positividade do HBsAg varia entre 2 a 7% são consideradas áreas de prevalência intermediária, essa é a situação da Europa oriental e central, Oriente Médio, subcontinente indiano e a Bacia Amazônica. Nesses locais a positividade sorológica de infecção passada é de 10-60% da população e o risco total de tornar-se infectado pelo HBV é estimado em 20-60% (TENGAN, 2006).

Em regiões como América do Norte, a Europa Ocidental e a Austrália, a positividade do HBsAg é menor que 2%, e a sorologia de infecção prévia é inferior a 10% (CHAVEZ et al., 2003; KEM et al., 2010; KIM et al., 2011), (Figura 1).



Figura 1- Distribuição mundial da infecção crônica pela HBV. As cores representam a distribuição do antígeno de superfície do HBV (HBsAg). As áreas identificadas com verde escuro são locais de alta prevalência com uma porcentagem igual ou superior a 8%. As regiões marcadas em verde claro são consideradas de prevalência intermediária com variação de 2 a 7%. Regiões que apresentam percentual abaixo de 2% são classificadas de baixa prevalência. (Fonte: KIM et al., 2011)

1.2.2 No Brasil

Segundo o Ministério da Saúde cerca de 15% da população brasileira já esteve em contato com o HBV, e aproximadamente 1% da população apresenta doença crônica. No entanto, são poucos os estudos epidemiológicos no Brasil sobre hepatites, sendo a real prevalência subestimada (BRASIL, 2014). Existem regiões consideradas de alto risco, como oeste do Paraná e em alguns locais da Amazônia (FOCACCIA, 2003; BRASIL et al., 2011).

Um estudo realizado para avaliar a prevalência de base populacional, das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil, mostrou que a região norte apresenta maior incidência de casos de hepatite B com aproximadamente 0,92% entre a população de 20 a 69 anos, seguida pela Região Centro-Oeste, com 0,76%, e a Região Sul, com 0,55% (BRASIL., 2011).

1.2.3 Em Rondônia

Em 2010 foi realizado no estado de Rondônia, localizado na região norte do país, um estudo com objetivo de avaliar a soro-prevalência de marcadores sorológicos de hepatite B, na população ribeirinha de Porto Velho. Foram processadas 431 amostras para exames sorológicos com os seguintes resultados: 192 positivas para anti-HBc Total (44,5%), 29 positivas para HBsAg (6,7%), 230 positivas para anti-HBsAg (53,4%). Então concluiu-se, que esta região ribeirinha do município de Porto Velho está classificada como uma região de prevalência intermediária para hepatite B (KATSURAGAWA et al., 2010).

Em outro estudo soro epidemiológico, foram analisadas 660 amostras de duas localidades da capital do estado, segundo os dados foi possível observar que as áreas analisadas são de baixa endemicidade para hepatite B crônica (SILVA et al, 2015).

1.3 VÍRUS DA HEPATITE B

O HBV pertence à família Hepadnaviridae gênero *Orthohepadnavirus* e infecta preferencialmente hepatócitos. Nesta família estão incluídas também, uma variedade de vírus aviários e de mamíferos que compartilham características similares, como organização genética, órgão de tropismo e estratégia de replicação (ICTV, 2013).

A partícula viral possui aproximadamente 42 nm de diâmetro. Apresenta em sua estrutura externa um envelope lipoproteico, onde estão presentes as proteínas de superfície (HBsAg). Internamente está localizado o capsídeo formado pelas proteínas do core (HBcAg) e seu material genético composto por DNA circular parcialmente duplo, formado pela fita completa e incompleta que corresponde entre 50 a 70% da fita completa (Figura 2), a fita incompleta apresenta polaridade positiva e a fita completa polaridade negativa, complementar ao RNA mensageiro (SÁNCHEZ et al., 2007)

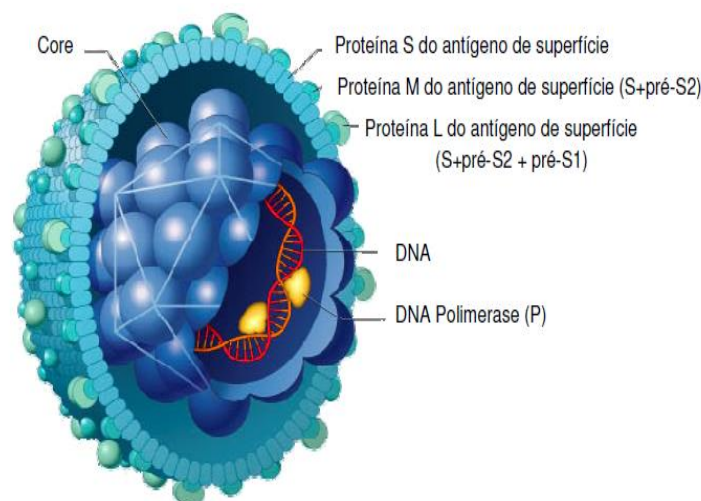


Figura 2- Estrutura do HBV. A partícula viral do HBV possui aproximadamente 42nm de diâmetro, externamente está localizado o envelope lipoprotéico, onde estão localizadas as proteínas de superfície, S, M e L. Internamente o capsídeo formado pela proteína do core, protege o genoma e a enzima viral. (Fonte: <http://www.rit.edu/~jcptaa/infectious.html>)

1.3.1 Genoma do HBV

O genoma do HBV é formado de aproximadamente 3.200 pares de bases, que codificam quatro unidades principais de transcrição, gene S, gene P, gene C e gene X conforme descrição na figura 3 (KAO, 2002).

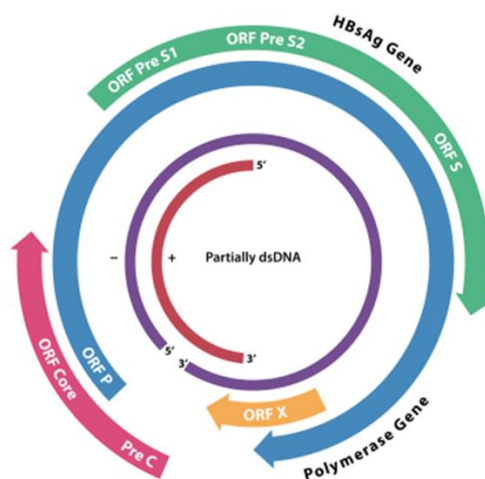


Figura 3- Organização genômica do HBV. O genoma do HBV codifica quatro regiões abertas de leitura (ORF), o gene S é responsável pela síntese das proteínas de superfície, o gene P origina a polimerase viral, o gene X codifica a proteína HBx e o gene C as proteínas HBe e HBc. (Fonte: BRASIL, 2015).

O gene S possui três sítios de iniciação de leitura, levando à síntese de três distintas proteínas de superfície com suas formas glicosiladas: a proteína S do inglês *Small surface protein* ou HBsAg, a proteína M do inglês *Medium surface protein* ou pré-S-2 e a proteína L do inglês *Large surface protein* ou pré-S-1. As regiões pré-S1 e pré-S2, durante a adsorção do HBV a célula alvo, interagem com receptor celular participando no processo de infecção dos hepatócitos, como elemento fundamental para que ocorra a infecção dos hepatócitos. Entre estes três peptídeos, o S é predominante, representando assim o principal antígeno de superfície (HBsAg) responsável pela indução da formação dos anticorpos anti-HBs (GONÇALES et al., 1998; KAO 2002).

O gene C e a região pré-core (pré-C) codificam as proteínas HBeAg e HBcAg com propriedades antigênicas distintas. A tradução a partir do códon de iniciação localizado na região pré-C dá origem a um produto que é translocado para o retículo endoplasmático, onde é clivado, resultando na formação de uma proteína solúvel, conhecida como HBeAg (RASTEGARVAND et al., 2015). O HBeAg não compõe os novos vírions, o qual então é secretado pelos hepatócitos e liberado na corrente sanguínea. Esse antígeno está associado a alta infecciosidade (HATZAKIS et al., 2006). Enquanto que o HBcAg é codificado a partir do códon de iniciação da região C, por sua vez esse antígeno é fundamental na formação do capsídeo viral (LIBERATO et al., 2002).

O gene X codifica a proteína X que tem sua função pouco elucidada. Atualmente é reconhecida como transativadora da transcrição viral, associada à fase de replicação, particularmente, na etapa de transcrição do DNA do HBV. Sua possível associação com o desenvolvimento de carcinoma hepático tem sido motivo de controvérsia (KOSHY e HOFSCHNEIDER, 1989; GERLICH, 2013).

O gene P codifica a DNA polimerase viral, uma enzima específica para o reparo do DNA. Essa enzima também possui atividade de transcriptase reversa, uma das principais características desse vírus, uma vez que a formação do DNA do HBV ocorre a partir de um molde RNA precursor (GONÇALES et al., 1998).

1.3.2 Genótipos do HBV

A variabilidade genética do HBV permite classificá-lo em dez genótipos, identificados em ordem alfabética de A-J (LIN; KAO, 2015). Análises filogenéticas demonstraram que os genótipos deste vírus podem ser divididos em subgenótipos, exceto os genótipos E e G. Nesse tipo de análise observa-se uma variabilidade de 8% entre cada

genótipo conhecido e de 4% entre os subgenótipos (CHU et al., 2002). Esses genótipos e subgenótipos possuem distribuição geográfica distinta (LIU et al., 2007).

O genótipo A é encontrado principalmente na Europa, Índia, África e América do Norte. Ele foi subdividido em dois subgenótipos A1 e A2. O subgenótipo A1 é de origem Europeia e o A2 Afro-Asiática (BOWYER et al., 1997; OWIREDU et al., 2001; KRAMVIS et al., 2002). Esta subdivisão foi baseada na sequência de aminoácidos do gene S do vírus B genótipo A. Nas sequências do subgenótipo A1 é observado Asn 207 e Leu 209, enquanto na sequência do A2 existe Ser 207 e Val 209 (NORDER et al., 1993).

Os genótipos B e C são predominantes no Leste e Sudeste Asiático e contém 3.215 nucleotídeos em seus genomas (BARTHOLOMEUSZ; SCHAEFER, 2004; WEBER, 2005). O genótipo B foi subdividido em quatro subgenótipos B1, B2, B3 e B4 e o C em quatro subgenótipos C1, C2, C3 e C4 (NORDER et al., 2004).

O Genótipo D possui uma deleção de 33 nucleotídeos na região Pré-S1 tendo somente 3.182 nucleotídeos em seu genoma. Como o genótipo A, o D também é muito difundido mundialmente, todavia ele é mais predominante nas áreas do Mediterrâneo, Índia, Rússia e Estados Unidos (BARTHOLOMEUSZ; SCHAEFER, 2004; WEBER, 2005). O genótipo D também possui subdivisão em quatro subgenótipos D1, D2, D3 e D4 (NORDER et al., 2004)

O Genótipo E é originário do Oeste da África (NORDER et al., 2004; WEBER, 2005). Apresenta deleção de três nucleotídeos na região da Polimerase (BARTHOLOMEUSZ; SCHAEFER, 2004; WEBER, 2005). O genótipo F subdividido em subgenótipos F1 e F2, é caracterizado por substituições específicas no produto do gene S, Leu 45 e Thr 45, respectivamente (ARAUZ-RUIZ et al., 1997; ARAUZ-RUIZ et al., 2002). Ele é prevalente na Polinésia, Estados Unidos e em populações aborígenes das Américas (NORDER et al., 2004; WEBER, 2005).

O genótipo G é originário dos Estados Unidos, México e Europa. Sequências do genótipo G compartilham duas únicas substituições, Gln51Leu e Thr63Ile, não encontradas em nenhum outro genótipo. A região S desse genótipo é altamente similar com a do genótipo A, porém, quando comparado com o seu genoma completo, o genótipo G possui uma grande divergência das demais sequências dos outros genótipos do HBV (NORDER et al., 2004). O genótipo G possui uma inserção de 36 nucleotídeos no códon

2 do gene do Core dando a sua sequência um total de 3.248 nucleotídeos (STUYVER et al., 2000).

Todas as sequências pertencentes ao genótipo H são oriundas da Nicarágua, México, Califórnia (ARAUZ-RUIZ et al., 2002) e América Central e Sul (BARTHOLOMEUSZ; SCHAEFER, 2004). As sequências desse genótipo são muito similares ao genótipo F (NORDER et al., 2004).

Alguns estudos relatam a influência genotípica na evolução clínica da doença. Os genótipos mais prevalentes na Ásia são os B e C, sendo o genótipo C relacionado a complicações mais graves (HUY et al., 2004). Outro estudo afirma que os pacientes com o genótipo C apresentam mais riscos de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (CHC) (SUGAUCHI et al., 2002). Em relação a resposta terapêutica, os indivíduos genótipos C e D são mal respondedores ao tratamento com interferon quando comparados aos genótipos A e B (ZHANG et al., 1996).

Além disso, indivíduos com genótipo B respondem melhor à terapêutica com interferon e lamivudina em comparação ao genótipo C, bem como apresenta resposta viral sustentada após tratamento (WAI et al., 2002). Já o genótipo A está menos associado ao desenvolvimento de mutação de resistência a lamivudina, durante o tratamento com análogos de nucleosídeos se for comparado ao genótipo D (AKUTA et al., 2005).

1.3.3 Replicação do HBV

Nas últimas décadas vários estudos colaboraram para compreensão do ciclo de replicação do HBV (SEEGER; MASON, 2000; GANEM; PRICE, 2004; NASSAL, 2008; GERLICH, 2013; NASSAL, 2015). Esses estudos mostraram que o processo inicia pela ligação do vírus à célula de tropismo, nessa fase um peptídeo codificado pela região pré-S1 interage com um receptor do hepatócito (GANEM; PRINCE, 2004).

Recentemente foram identificados dois receptores para o HBV. Foi observado que a princípio, o vírus se liga com baixa afinidade ao proteoglicano de sulfato heparan (PGHS) e posteriormente com maior afinidade ao polipeptídeo cotransportador de taurocolato de sódio (NTCP) (Figura 4A). O NTCP atua no transporte de ácidos biliares no fígado, constitui-se um polipeptídeo transportador múltiplo transmembranar expresso predominantemente no fígado de espécies susceptíveis ao HBV, reconhecido como um

receptor funcional para infecciosidade em humanos. (SUREAU, 2013; GERLICH, 2013; YAN et al., 2014; YAN e LI., 2015).

Após a etapa de adsorção o HBV entra na célula por um processo de endocitose mediada por receptor, seu envelope sofre fusão com a membrana do endossoma, posteriormente o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma, e finalmente translocado para o núcleo da célula (SEEGER; MASON, 2000).

Acredita-se que o capsídeo viral sofra um processo de desintegração na membrana nuclear (RABE et al., 2003), o que resulta na liberação o DNA do HBV para o interior do núcleo (GISH; LOCARNINI, 2006). Posteriormente, a DNA polimerase viral complementa a fita positiva de DNA, gerando uma cadeia circular covalente fechada de DNA (cccDNA). O cccDNA por ação da RNA polimerase II celular serve de molde para transcrição do RNA pré-genômico e três RNAs subgenômicos.

Os RNAs subgenômicos atuam como RNAs mensageiros (RNAm). Dos quais dois serão traduzidos nas proteínas do envelope (Pré-S1-RNAm de 2,4 kb, pré-S2/S-RNAm de 2,1 kb) e o outro na proteína HBx (X-RNAm de 0,8 kb). O RNA pré-genômico com cerca de 3,5 kb que será convertido no DNA genômico viral. Além de servir como RNAm para tradução das proteínas HBeAg, HBcAg e polimerase viral (GOMES-SOARES, 2005).

Após a síntese dos RNAs, eles são transportados para o citoplasma onde ocorre síntese proteica viral e montagem da nova partícula. Nesse processo o RNA pré-genômico juntamente com a DNA polimerase viral, são encapsidados com auxílio de chaperonas celulares. Por ação da enzima viral ocorre o processo de transcrição reversa, sendo originada a fita de DNA negativa. Em seguida, por ação do domínio catalítico de ribonuclease (RNaseH) da DNA polimerase viral, ocorre degradação do RNA molde e finalmente a síntese da cadeia positiva é então iniciada (GERLICH, 2013).

As partículas do core, contendo DNA viral, podem ser direcionadas novamente para o núcleo ou se associarem as proteínas do envelope e brotarem da célula hospedeira. Há assim, 2 fontes de cccDNA: as novas partículas virais que entram no hepatócito e a translocação para o núcleo das partículas recém sintetizadas (LOK; MCMAHON, 2001), conforme representado na figura 4B.

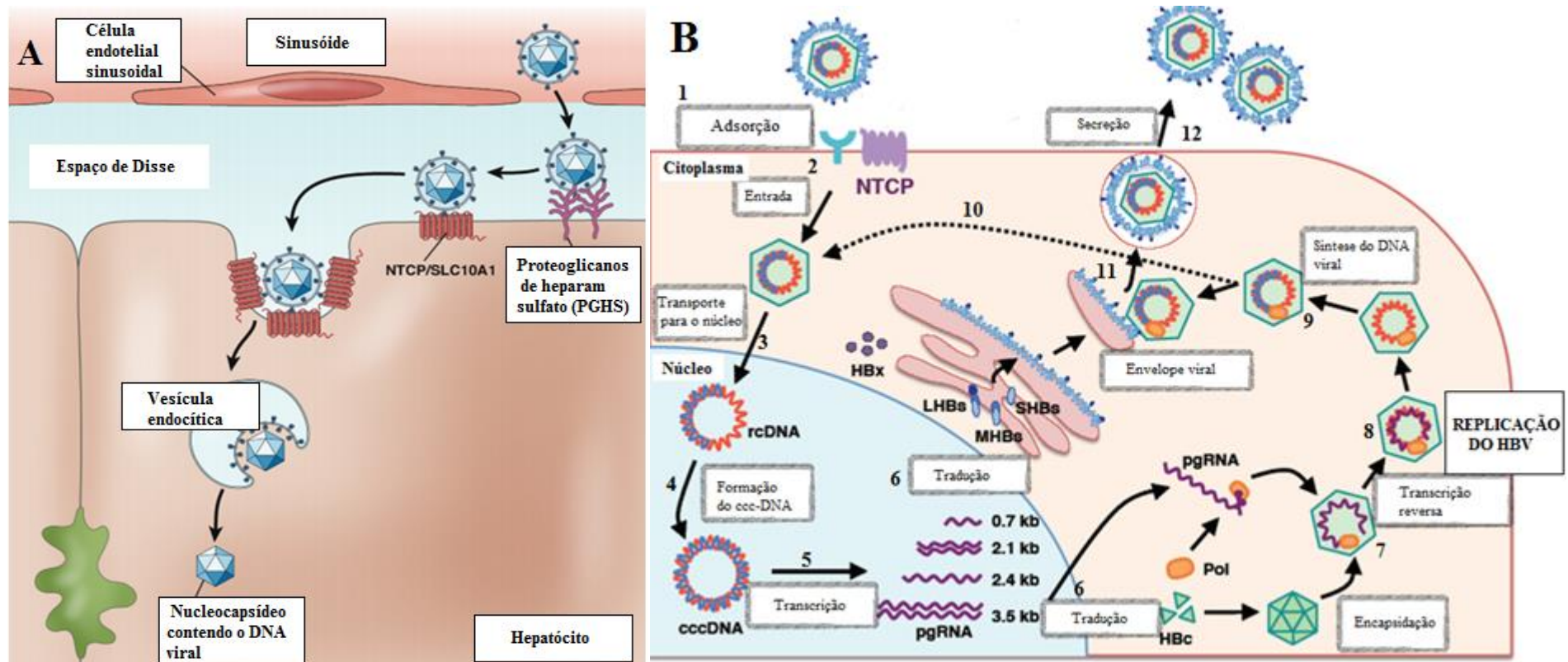


Figura 4- Ciclo de replicação do HBV. 4A- O domínio peptídico da região Pré-S1 interage no momento da adsorção com dois receptores celulares, as proteoglicanas sulfato de heparan (PGHS) e o polipeptídeo transportador de taurocolato de sódio (NTCP), definindo o tropismo celular. 4B- 1- etapa da adsorção, onde o vírus reconhece a célula de tropismo pela interação da região Pré-S1 com receptores específicos. 2- Após adsorção o vírus entra na célula por endocitose mediada por receptor. 3- O nucleocapsídeo é direcionado para o núcleo da célula hospedeira, na membrana nuclear o capsídeo viral sofre degradação. 4- Através do processo de reparo, o DNA viral parcialmente duplo é convertido em cadeia dupla completa, denominada de ccc-DNA. 5- Ocorre formação dos mRNAs e RNA subgenômico pelo processo de transcrição. 6- As proteínas virais são traduzidas. 7- Inicia a montagem da nova partícula viral. 7- A DNA polimerase viral realiza o processo de transcrição reversa. 8- Síntese da fita de DNA negativa (completa). 9- Síntese da fita de DNA positiva (incompleta). 10- A nova partícula viral pode ser direcionada para o núcleo celular. 11- Ou associar-se ao envelope viral. 12- Sendo então liberada da célula por exocitose. (Fonte: 4 A- Gastroenterology 2014;147:48–64 / 4 B- Int. J. Mol. Sci. 2014, 15, 2892-2905)

1.3.4 Vírus mutante

As mutações no genoma do HBV podem ocorrer em qualquer região gênica, e estão relacionadas a fatores do hospedeiro e características do próprio vírus. Causas exógenas, também podem contribuir para essas mutações, como a utilização de medicamentos como análogos de núcleos(t)ídeos ou uso de vacinas e imunoglobulinas específicas para o HBV (CHOTIYAPUTTA; LOK, 2009). Entre as características próprias do HBV, é importante ressaltar os elevados níveis de replicação viral, que peculiarmente são encontradas nessa doença, evento considerado importante na determinação dessas mutações (RASTEGARVAND et al., 2015).

Além disso, as RNAs polimerases envolvidas na replicação viral, não possuem atividade de revisão e correção nucleotídica, ocorrendo aproximadamente um erro a cada 10^4 nucleotídeos copiados para RNA (CHOTIYAPUTTA; LOK, 2009). Dessa forma, as altas taxas de replicação associadas a pouca “fidelidade” no processo de replicação, resultam em mutações. Vários fatores podem influenciar a taxa de mutação, sendo de grande relevância a fase clínica da doença, como a imunotolerância, imunoeliminação, imunossupressão, transplante ou tratamento (GONÇALES, 2006).

Entre as principais mutações do HBV de importância clínica, estão as do gene core/pré-core, da região da polimerase e do gene de superfície (GONÇALES, 2006). Mutações de escape na região pré-S/S foram descritas, associadas a resultados falsos positivos em alguns ensaios sorológicos negativos para o HBsAg (CABRERIZO et al., 2000). Assim, a relação precisa entre mutações nas regiões pré-S1 e pré-S2 e o desenvolvimento de infecção oculta permanece indefinida (BLENDIS et al., 2003). A mutação descrita no gene P (da polimerase) relaciona-se fortemente aos fármacos antivirais utilizados no tratamento (MUTIMER, 2001). Existem várias mutações pontuais que geram a inibição da síntese do HBeAg, a mais comum é a introdução de um códon de parada em vez de um triptofano no final da sequência pré-C, evitando assim a tradução do precursor do HBeAg. A mutação pré-core é relatada como fator predisponente a evolução mais rápida para cirrose (FERREIRA, 2000).

1.4 QUADRO CLINICO DA HEPATITE B

Desde sua identificação essa doença foi classificada como hepatite de longo período de incubação, durando cerca de 45 a 180 dias. Após esse período os indivíduos infectados desenvolvem quadro de hepatite aguda, na maioria subclínica, no qual, a forma ictérica

está presente em aproximadamente 30% dos indivíduos adultos, sendo esse valor ainda menor em crianças (FONSECA, 2007, BRASIL 2011).

O curso da doença depende de alguns fatores como: sexo, idade no momento da infecção, fase clínica no diagnóstico, carga viral, estado imunológico do indivíduo, ativação da resposta imune e coinfeções com outros vírus, em especial HDV, HCV e HIV (FERREIRA, 2000).

1.4.1 Infecção aguda do HBV

A fase aguda dessa infecção é caracterizada pela alta taxa de replicação viral, presente tanto nas formas sintomáticas, ictéricas da doença, quanto nas anictéricas e até assintomáticas. Após aproximadamente 6 semanas do período de incubação, o HBsAg está presente na circulação e a intensa replicação viral ativa o sistema imunológico, surgindo então na circulação o anticorpo anti-HBc. O HBsAg pode permanecer positivo na fase aguda por até 180 dias, período que, então, desaparece da circulação. Nos casos de fase aguda com evolução para cura, após o período de janela imunológica, com duração de aproximadamente 12 semanas, surge o anticorpo anti-HBs (HOOFNAGLE; DI BISCEGLIE, 1991; GERLICH, 2013), figura 5.

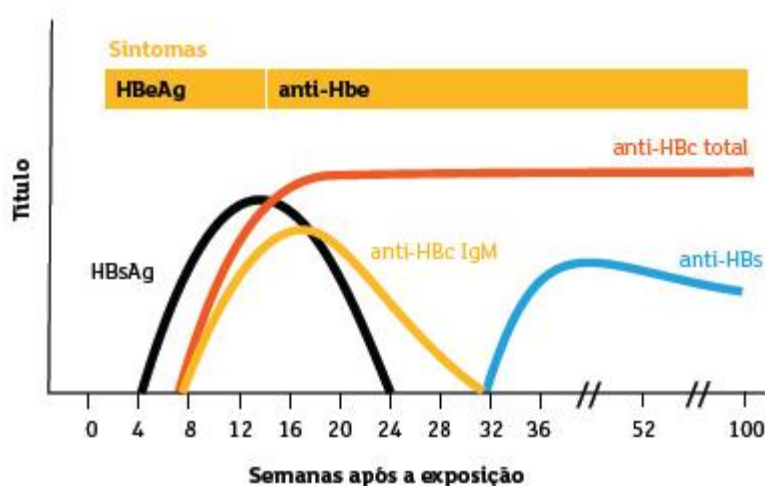


Figura 5- Curso sorológico típico de uma infecção aguda pelo HBV. Após o período de incubação, o HBsAg é o primeiro marcador presente na circulação, posteriormente, surge o anticorpo anti-HBc. O HBsAg pode permanecer positivo na fase aguda por até 180 dias, período que então desaparece da circulação, e posteriormente ao período de janela imunológica surge o anticorpo anti-HBs. (Fonte: <http://www.amaissaude.com.br/medicos/hepatite-viral.aspx>)

Nos indivíduos adultos expostos exclusivamente ao HBV, a cura espontânea ocorre em cerca de 90% dos casos (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2007). Apenas 5 a 10% dos

casos em adultos, em geral pacientes com sistema imunológico comprometido, evoluem para formas crônicas da infecção (THIMME et al., 2003; BRASIL, 2011). Isso é o oposto em recém nascidos, já que cerca de 90% dos recém-nascidos infectados no período pré-natal ou antes dos 5 anos de idade desenvolverão infecção crônica pelo HBV (transmissão vertical) (YIM; LOK, 2006).

1.4.2 Infecção crônica do HBV

A fase crônica da hepatite B é caracterizada pela permanência do HBsAg na circulação por mais de 6 meses. Quando a infecção ocorre até os cinco anos de idade, é possível classificar a fase crônica em quatro fases:

1. Imunotolerância- observada nos primeiros anos de vida, fase caracterizada por intensa replicação viral, porém com tolerância pelo sistema imunológico, assim sem dano hepático.
2. Imunorreativa- onde ocorre fim da tolerância imunológica, devido alta taxa de replicação e ativação do sistema imune ocorre lesão hepática representada pela elevação das transaminases.
3. Portador inativo- representada por baixos níveis de replicação viral e transaminases, geralmente nessa fase ocorre a soroconversão para anti-HBe.
4. Reativação- alguns portadores podem ainda evoluir para uma quarta fase, caracterizada pela reativação viral com elevados níveis de DNA/HBV e transaminases (RAIMONDO et al., 2003).

1.4.3 Infecção oculta

Alguns autores classificam a hepatite B oculta, como infecção causada por vírus mutante derivado do vírus da hepatite B (HBV) nos quais não se consegue detectar o HBsAg (SHAFRITZ et al., 1982; PINHO, 2005). Em 2008, especialistas internacionais redefiniram a infecção oculta pelo HBV como a presença de DNA/HBV no fígado (com ou sem HBV DNA detectável no soro) em indivíduos sorologicamente negativos para HBsAg e geralmente com carga viral muito baixa (<200UI/mL). Dependendo dos anticorpos do HBV encontrados, a OBI pode ser soropositiva (anti-HBc e/ou anti-HBs positivo) ou soronegativa (anti-HBc e anti-HBsAg negativos) (>20%) (RAIMONDO et al., 2008), figura 6.

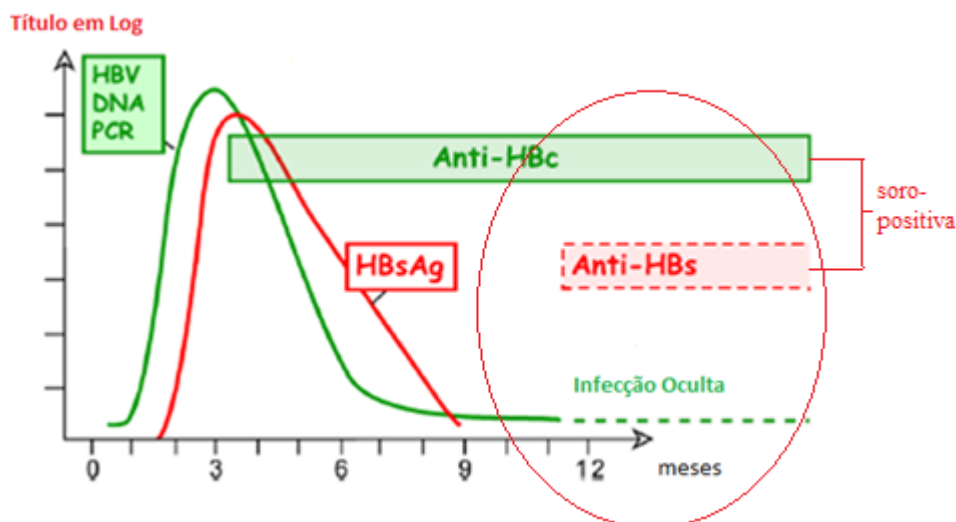


Figura 6- Representação sorológica de infecção aguda pelo HBV. A fase aguda pode evoluir de diferentes formas, na ilustração é possível observar os marcadores presentes na infecção oculta. Caracterizada pela expressão em baixos níveis de DNA-HBV (detectado por PCR) e sorologicamente pode ser soropositiva quando são reagentes o anti-HBc e/ou anti-HBs ou soronegativa quando o anti-HBc e anti-HBsAg forem não reagentes. (Fonte: Adaptado: GERLICH, VIROLOGY JOURNAL, 2013)

A base molecular da infecção oculta está na persistência intra-hepática do ccc-DNA, a forte supressão da replicação viral e expressão gênica. A resposta imune do hospedeiro, a coinfeção com outros agentes infecciosos e vários fatores epigenéticos, provavelmente desempenham um papel relevante na inibição do HBV (RAIMONDO et al., 2007; LEVRERO et al., 2009).

O padrão-ouro para o diagnóstico da OBI é a análise de DNA/HBV de extratos do fígado e amostras de sangue. Como amostras de fígado estão disponíveis apenas em uma minoria dos casos, o diagnóstico mais comum da OBI é baseado na análise de amostras de soro (RAIMONDO, 2008).

O monitoramento dos níveis de HBV-DNA é útil na gestão de pacientes com OBI em dois aspectos: (1) para prever o risco de cirrose ou HCC, e (2) decidir sobre a possibilidade de tratamento antiviral para prevenir a reativação do HBV ou transmissão, no caso de transplante (CHEMIN et al., 2009). No entanto, o papel da OBI na aceleração do desenvolvimento de cirrose ainda não está claro. Estudos prospectivos com critérios bem definidos de seleção dos pacientes e técnicas padronizadas de laboratório são necessários (HU, 2002; CHEMIN e TREPO, 2005; RAIMONDO et al., 2008).

1.5 TRANSMISSÃO DO HBV

O HBV é encontrado em diversos fluídos corporais, porém somente o sangue, a saliva e o sêmen têm demonstrado ser infecciosos (ALTER, 2003; KIDD-LJUNGGREN et al., 2006). As vias de transmissão reconhecidas são por via perinatal, percutânea, exposição sexual e horizontal. Este último ocorre especialmente por contato intra-domiciliar entre as crianças, presumivelmente por cortes ou feridas abertas. A transmissão vertical, caracterizada pela infecção durante o primeiro ano de vida, resulta em infecção crônica em >90% dos casos (GANEM; PRINCE, 2004).

Atualmente a rigorosa triagem realizada em bancos de sangue, praticamente eliminou de algumas áreas geográficas a transmissão transfusional. O contágio parenteral ocorre apenas em casos de usuários de drogas injetáveis, em acidentes ocupacionais com profissionais da área da saúde, além de algumas situações mais raras, como sessões de acupuntura e tatuagens com materiais não descartáveis e mal esterilizados (ALTER, 2003). A presença do HBV no sêmen e nas secreções vaginais facilita a passagem de partículas infectantes através das superfícies mucosas, durante a relação sexual. A hepatite B é classificada como uma das mais importantes doenças sexualmente transmissíveis (LOK, 2001).

Sabe-se que o HBV circula em altas concentrações no sangue e em níveis baixos nos outros fluidos orgânicos, e que é cerca 100 vezes mais infeccioso que o HIV e 10 vezes mais do que o HCV (CDC, 2003). O sangue e os outros fluidos orgânicos de um portador do HBV já podem ser infectantes duas a três semanas antes de aparecerem os primeiros sinais da doença, e se mantém assim durante a fase aguda (FONSECA, 2010).

1.6 DIAGNOSTICO LABORATORIAL DA HEPATITE B

1.6.1 Diagnóstico inespecífico

1.6.1.1 Testes de lesão hepática

A quantificação de enzimas transaminases (ou aminotransferases) AST (aspartato aminotransferases) e ALT (alanina aminotransferases), anteriormente chamadas TGO (transaminase glutâmico-oxalacética) e TGP (transaminase glutâmico-pirúvica) respectivamente, deve ser utilizada para o acompanhamento clínico e decisão terapêutica. Porém esses testes de função hepática, apesar de serem indicadores sensíveis do dano do parênquima hepático, não são específicos para a hepatite B. Contudo ocorre uma

elevação, normalmente acima de 10 vezes do limite superior da normalidade, geralmente com predomínio da TGP sobre TGO (BRASIL, 2009).

1.6.1.2 Biópsia hepática

A biópsia hepática é uma técnica de diagnóstico invasiva, considerada fundamental na área da hepatologia, com utilidade na abordagem do doente com patologia hepática primária ou secundária (MACEDO, 2000). É considerado o teste mais específico para avaliar a natureza e severidade das doenças hepáticas, fornecendo informações importantes para o estadiamento e prognóstico de várias situações clínicas (BRAVO et al., 2001).

A biópsia hepática apresenta várias aplicações dentro do contexto da infecção pelo HBV, pois possibilita: avaliar a necessidade de tratamento, servir como parâmetro de avaliação da evolução da doença em biópsias futuras, ajudando nas decisões terapêuticas, e avaliar presença e graduação da fibrose (FELD; HEATHCOTE, 2006). No Brasil este procedimento é realizado segundo o protocolo de critérios do Consenso Nacional das Hepatites Crônicas da Sociedade Brasileira de Patologia (SBP).

1.6.2 Marcadores sorológicos do HBV

Os exames específicos para o diagnóstico da infecção são os imunoenaios, baseados na detecção dos antígenos virais e seus respectivos anticorpos e os de biologia molecular que detectam o DNA do HBV (SARMAST et al., 2015). Os testes mais utilizados no diagnóstico sorológico são os ensaios imunoenzimáticos (EIA). Esses ensaios se caracterizam pela adsorção de um antígeno ou anticorpo em suporte sólido, geralmente no fundo de microplacas. Um antígeno ou anticorpo específico, presente na amostra a ser testada é adicionado, então este complexo antígeno-anticorpo é detectado por um outro antígeno ou anticorpo conjugado com enzima. Essa enzima conjugada ao antígeno ou anticorpo é capaz de catalisar a reação, quando adicionado o substrato, produzindo uma reação de oxidação que gera uma cor. Esta reação colorimétrica é medida e pode gerar resultados quantitativos quando baseado em controles (*cut off*) ou qualitativos (reagente ou não reagente), (GONÇALES, 2006; HUSA et al., 2014; WAN; DOU, 2014).

1.6.2.1 HBsAg/Anti-HBs

O HBsAg aparece no soro 1 a 10 semanas após uma exposição aguda ao HBV e

aproximadamente 2 a 6 semanas antes do início dos sintomas de hepatite ou elevação das transaminases. A persistência do HBsAg por mais de 6 meses na corrente sanguínea caracteriza infecção crônica. Na prática, todos os indivíduos HBsAg positivos devem ser considerados infectantes. Após 12 semanas do desaparecimento do HBsAg, é possível detectar o anti-HBs na circulação, indicando cura e imunidade. Em muitos pacientes esse anticorpo persiste toda a vida conferindo assim imunidade a longo prazo. Assim, caracteriza imunidade ao HBV, quando presente de forma isolada caracteriza imunidade vacinal, quando juntamente com o anti-HBc total caracteriza imunidade por contato com o vírus (HOOFNAGLE, 2003).

1.6.2.2 HBeAg e anti-HBe

O HBeAg é considerado um marcador de replicação e de infecciosidade do HBV. A sua presença está geralmente associada com a detecção do DNA viral no soro. Porém a falta deste antígeno na circulação não caracteriza ausência de replicação viral, isso devido aos pacientes que apresentam mutações na região pré-core ou do core promoter, nessas situações o HBeAg não é secretado. Durante a infecção aguda o HBeAg surge pouco tempo após o aparecimento do HBsAg. Em pacientes que evoluem para cura, a soroconversão do HBeAg para anti-HBe precede a soroconversão do HBsAg para anti-HBs. O anti-HBe pode persistir muitos anos após a resolução da hepatite aguda. Em pacientes com infecção crônica, o HBeAg pode persistir de anos a décadas. Durante a fase de HBeAg positivo a maior parte dos pacientes têm DNA do HBV detectável no soro e doença hepática ativa. Na infecção aguda o DNA viral é detectado durante um curto intervalo desaparecendo antes da normalização das aminotransferases e da perda do HBeAg e do HBsAg (SINTRA, 2003). Diferentemente do HBcAg, o HBeAg é solúvel e não estrutural (LIBERATO et al., 2002).

1.6.2.3 Anti-HBc total (IgG e IgM)

O HBcAg é um antígeno intracelular, insolúvel e não pode ser detectado no soro, porém ativa a produção de anticorpos específicos. O anti-HBc IgM é o segundo marcador sorológico a ser detectado, aparece no início dos sintomas, em decorrência da ativação do sistema imune diante da alta replicação viral, cerca de 30 dias após o aparecimento do HBsAg, ou durante o período que os testes bioquímicos hepáticos ficam alterados, na infecção aguda. Durante a recuperação o título de anti-HBc IgM diminui enquanto aumenta o título de anti-HBc IgG (GERLICH, 2013).

Assim, a detecção do anti-HBc IgM é geralmente representativa de uma infecção aguda pelo HBV. Mas, em cerca de 20% dos doentes o anti-HBc IgM permanece detectável durante 2 anos após a infecção aguda (GOLÇALVES, 2013). Para o diagnóstico de HVB aguda, o teste do anti-HBc IgM só deve ser considerado em indivíduos com evidências clínicas de HBV aguda ou em casos que tenham evidências epidemiológicas. O anti-HBc IgG geralmente persiste por toda a vida do indivíduo infectado pelo HBV, é considerado um marcador de infecção pregressa do HBV (GONÇALES, 2006).

A interpretação do anti-HBc positivo depende da presença concomitante de outros marcadores. Quando associado à positividade do HBsAg indica infecção viral. Quando associado à positividade do anti-HBs configura o perfil de imunidade contra hepatite B devido à infecção passada. Em alguns casos há indivíduos que apresentam anti-HBc como único marcador de infecção, chamados de indivíduos com anti-HBc total isolado. Este padrão sorológico é o segundo mais frequente em infecção pelo HBV, ocorrendo em cerca de 30% dos pacientes infectados pelo HBV (WEBER et al., 2001; PIROTH et al., 2002; SHIRE et al., 2004).

1.6.3 Marcadores virológicos

A determinação do DNA/HBV utilizando a biologia molecular é um parâmetro para identificar, quantificar a taxa de replicação viral, genotipagem e análise de mutações. O desenvolvimento e a implementação de métodos específicos e altamente sensíveis para detecção do DNA/HBV permitiram avaliar melhor a evolução clínica dos pacientes infectados, além de monitorar e avaliar a eficácia terapêutica aplicada (GONÇALES, 2006). Os crescentes avanços nas áreas da virologia e da biologia molecular desse vírus nas últimas décadas, foram progressivamente sendo incorporados à rotina laboratorial, permitindo o uso de exames complementares utilizando técnicas como, PCR convencional e PCR em tempo real, capazes de determinar taxa de replicação do paciente, identificação de mutações com diferentes importâncias clínicas, genotipagem viral e a eficácia de novas medicações utilizadas no tratamento dessa infecção (BOTELHO et al., 2014).

Na figura 7 é possível observar uma síntese dos marcadores utilizados no diagnóstico inespecífico e específico da hepatite B.

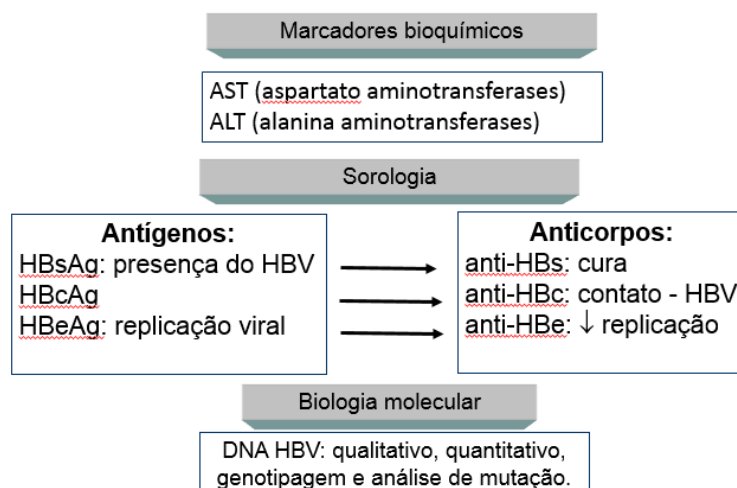


Figura 7- Diagnóstico para hepatite B. A dosagem das aminotransferases (AST e ALT) é utilizada como marcadores bioquímicos de lesão hepática, aplicada no diagnóstico inespecífico para infecção pelo HBV. A sorologia através da identificação de anticorpos e antígenos virais são utilizados juntamente com técnicas de biologia molecular no diagnóstico específico viral.

1.7 RESPOSTA IMUNOLÓGICA AO HBV

Como já relatado, o HBV quando adquirido na vida adulta, a infecção é geralmente autolimitada. Enquanto a persistência crônica, é observada na infecção durante os primeiros anos de vida. As respostas imunológicas para o HBV são responsáveis tanto para eliminação do vírus, quanto para a patogênese na evolução clínica da infecção (DUNN et al., 2009). Em indivíduos infectados, a depuração viral na fase aguda é associada a uma eficiente resposta imunológica. Caracterizados por resposta das células T antivirais multiespecíficos que são precedidos por uma ineficiente atuação de respostas inatas intracelulares nas fases iniciais da infecção (LUCIFORA et al., 2010; REHERMANN, 2013).

As respostas imunes envolvidas na eliminação viral durante a fase aguda, envolvem a imunidade humoral e a celular. O complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II, pode contribuir para geração de anticorpos específicos contra as proteínas do envelope, presentes nas partículas virais circulantes. As células T CD8⁺ eliminam as células infectadas através da interação entre os receptores de células T (TCR) presentes na sua superfície e as moléculas de MHC de classe I, expressas associadas a peptídeos antigênicos na superfície dos hepatócitos infectados (WIELAND; CHISARI, 2005; DAS; MAINI, 2010).

O controle persistente da infecção é fornecido pela memória imunológica de longa duração. Dessa forma, provavelmente ocorre um estímulo contínuo para sustentação do

controle pelo sistema imunitário, por resíduos de vírus que nunca são totalmente eliminados, persistindo em uma forma episomal oculta no núcleo das células do fígado, mesmo após a recuperação de infecção aguda (WHERRY et al., 2004).

A persistência crônica do vírus é caracterizada por ausência na maturação da memória imunológica e por exaustão na resposta das células T específicas para o HBV (NEBBIA et al., 2012). A exposição persistente de células T a cargas elevadas de antígenos virais é um fator determinante da deficiência de células T funcional, mas também outros mecanismos podem contribuir para a inibição de células T, incluindo o efeito tolerogênico do ambiente hepático (SCHURICH et al., 2011).

Dessa forma, o grau de deficiência de células T é variável e está relacionada com o nível de carga viral. A função antiviral das células T é mais eficaz em pessoas que conseguem controlar a infecção, mesmo que parcialmente, isso acontece com os portadores de HBsAg negativos que expressam baixos níveis de replicação viral (exemplo portadores de hepatite B oculta). Alguns portadores conseguem eliminar completamente o vírus, como os indivíduos que conseguem espontaneamente ou após terapia antiviral, depurar o HBsAg. Assim, a compreensão das características das respostas imunológicas associadas ao controle da infecção, é necessária para que novas estratégias de prevenção e tratamento eficientes sejam desenvolvidas (KOH, 2013; MAINI; PEPPA, 2013, LIU et al., 2014).

1.8 TRATAMENTO DA HEPATITE B

O objetivo a longo prazo do tratamento dos pacientes com hepatite B crônica é para prevenir o desenvolvimento de cirrose e hepatocarcinoma celular. No Brasil, o protocolo de tratamento para o HBV, segue a Portaria 2.561/GM de 28 de outubro de 2009 do Ministério da Saúde, onde são preconizados os seguintes fármacos: interferon-alfa, interferon-alfa peguilado, lamivudina, tenofovir, entecavir e adefovir.

O interferon alfa tem propriedades antivírica, antiproliferativa e imunomoduladora conferindo supressão da replicação viral e remissão da doença hepática. O interferon-alfa foi a primeira droga aprovada para tratamento da hepatite B crônica (LOK et al., 2000). O Interferon alfa peguilado tornou-se disponível mais recentemente. O interferon peguilado 2a (PEG2a) consiste num derivado do IFN convencional, porém ligado a uma molécula de polietilenoglicol, o que confere a vantagem de prolongar o efeito biológico e a necessidade de menos aplicações, comparado ao convencional (KEEFFE et al., 2006).

Contudo, o PEG2a não é indicado como tratamento de manutenção por causa dos efeitos adversos, uma vez que é menos tolerado em longo prazo, também não é indicado em pacientes com doença hepática descompensada (ALMEIDA et al., 2009).

A lamivudina, um análogo de nucleosídeo, apresenta potente ação contra a transcriptase reversa. Ela inibe a síntese do DNA do HBV, a partir do RNA pré-genômico bloqueando, portanto a síntese de novas partículas virais (LOK e MCMAHON, 2007). Trata-se de um potente inibidor de replicação do HBV que proporciona resposta na maioria dos pacientes, promovendo a soroconversão do HBeAg para seu respectivo anticorpo (DIENSTAG et al., 1995). Essa opção terapêutica é indicada para os pacientes HBeAg negativo, com altas taxas de DNA do HBV e ALT (SHEPHERD et al., 2006). Porém, este fármaco apresenta desvantagem de ser um antiviral com baixa barreira genética (BRASIL, 2011). Assim, foi observado cerca de 75% de resistência após 5 anos de tratamento (PETERSEN e BUTI, 2012). Portanto, devido as características de baixa barreira genética e elevado potencial de resistência, atualmente este fármaco não é indicado para monoterapia e nem como primeira escolha terapêutica em pacientes virgens de tratamento ou não respondedores ao interferon (BRASIL, 2011).

O adefovir é um análogo dos nucleotídeos de largo espectro com potente ação antivírica contra o HBV. Ele inibe a transcriptase reversa e a atividade da DNA polimerase. É incorporado ao DNA viral e termina com a extensão da cadeia de DNA pró-viral. Foi aprovado pela FDA em setembro de 2002 para tratamento da hepatite B crônica (MARCELLIN et al., 2003).

O tenofovir é um fármaco aprovado recentemente para tratamento da hepatite B crônica, na Europa como também nos Estados Unidos (LOK e MCMAHON, 2009). Trata-se de um análogo nucleotídeo que bloqueia a ação da enzima transcriptase reversa. Pertence à mesma classe do adefovir; porém, é mais eficiente no bloqueio da replicação viral e maior rapidez de ação. Apresenta também melhor perfil de resistência, pois tem maior barreira genética (BRASIL, 2011).

O entecavir é um análogo nucleosídeo da guanosina que bloqueia as três funções da DNA polimerase do HBV – a iniciação, a síntese dependente do DNA e a transcrição reversa. Estudos preliminares em humanos comprovaram que o entecavir está relacionado com a diminuição da incidência de hepatocarcinoma e aumentar a sobrevida dos indivíduos com hepatite crônica por HBV (LEVINE et al., 2002).

1.9 PROFILAXIA DA HEPATITE B

A forma mais eficiente de se prevenir uma infecção pelo HBV é através da vacinação (CDC, 2002). As condutas aplicadas para evitar a transmissão viral são constituídas por quatro componentes:

- Prevenção de infecção perinatal, através do acompanhamento da mãe portadora e de profilaxia pós exposição dos recém-nascidos de mães HBsAg positivo.
- Vacinação contra hepatite B de todas as crianças, visando prevenir a infecção na infância e em idade mais avançadas;
- Vacinação dos adolescentes que não foram imunizados;
- Vacinação de indivíduos pertencentes a grupos de risco (FERREIRA, 2000).

Além disso, os bancos de sangue realizam triagem sorológica dos doadores para os marcadores HBsAg e anti-HBc em todo mundo, o que tem contribuído para redução da hepatite B pós-transfusional, entretanto o risco de transmissão permanece nos portadores assintomático HBsAg negativos (HOU et al., 2005).

Os primeiros estudos sobre a vacina contra o HBV aconteceram em 1982. A princípio a vacina era produzida a partir de amostras de pacientes com hepatite B crônica, o HBsAg era extraído do plasma e inativado por reações físico-químicas (INFORME TÉCNICO INSTITUCIONAL, 2006).

Atualmente a vacina contra a hepatite B é produzida por engenharia genética, na qual é clonado numa levedura o gene para produzir um peptídeo correspondente ao antígeno de superfície do HBV (HBsAg). A vacinação no Brasil passou a ser obrigatória e regular para crianças em 1997, porém somente em 1998 foi implantada no calendário do Programa Nacional de Imunizações (PNI). O esquema de imunização preconiza três doses sendo, momento zero, um e seis meses posteriores a primeira dose (CDC, 2000).

2 JUSTIFICATIVA

Apesar da disponibilidade da vacina, da triagem sorológica realizada nos bancos de sangue e nos processos de hemodiálise e transplante de órgãos, a hepatite B ainda é considerada um grande problema de saúde pública em todo mundo (SILVEIRA, 2004; RASTEGARVAND et al., 2015). A detecção precoce do HBsAg e do anti-HBc total na triagem reduz significativamente o risco de adquirir a infecção através desses eventos (KUHNS, 2004).

No entanto, existem duas situações no curso da infecção, onde está detecção não é eficaz. Uma ocorre na fase aguda, onde há um período de janela imunológica, quando o HBsAg pode ser indetectável no soro (DATTA, 2007). A outra situação pode acontecer durante a fase crônica, quando ocorre a chamada infecção oculta, definida como a presença de HBV DNA no fígado (com ou sem HBV DNA detectável no soro) em indivíduos com teste para HBsAg negativo e geralmente com carga viral muito baixa (<200UI/mL) (RAIMONDO, 2008). A redução do risco de transmissão nessas situações depende da aplicação de testes mais sensíveis para antígeno de superfície do HBV (HBsAg), triagem para anti-HBc, e implementação de teste de ácido nucléico (NAT) (CANDOTTI, 2009; RASTEGARVAND et al., 2015). Assim, este estudo teve como objetivo desenvolver um método de diagnóstico ultrasensível, utilizando a técnica de PCR em tempo real.

A tecnologia de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real tem favorecido o aperfeiçoamento de testes diagnósticos. Estudos mostram que este tipo de tecnologia oferece maior rapidez nas análises de resultados, além de manter excelentes níveis de sensibilidade e especificidade (ARYA, 2005; GUNSON, 2006). Metodologias de análise baseadas na PCR em tempo real têm sido desenvolvidas para o diagnóstico do HBV e outras patologias em laboratórios clínicos (PAS, 2000; WEISS, 2004; SANTOS et al., 2014; BOTELHO et al., 2014).

O monitoramento da carga viral é importante para diagnosticar a replicação viral, estabelecer o prognóstico da doença hepática, avaliar o risco de progressão da doença, identificar os pacientes que precisam de terapia antiviral, monitorar a resposta virológica ao tratamento e, recentemente, vem se mostrando como importante ferramenta para triagem do DNA HBV. Vários tipos de ensaios de detecção e quantificação estão atualmente em uso com uma eficácia diferente.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar a hepatite B oculta em indivíduos com anti-HBc isolado, utilizando um método molecular ultrasensível.

3.2 ESPECÍFICOS

- Otimizar a sensibilidade do método de PCR real time “*in house*”, testando diferentes volumes de eluição de DNA.
- Analisar a especificidade, reprodutibilidade e sensibilidade analítica do método.
- Validar o método de PCR real time *in house* correlacionado os valores com o padrão internacional preconizado pela Organização Mundial de Saúde.
- Identificar e quantificar o DNA-HBV em amostras de indivíduos anti-HBc isolado.
- Avaliar fatores prognósticos nos portadores de infecção oculta.

4 METODOLOGIA

4.1 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi desenvolvido no Ambulatório de Hepatites do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM), localizado na BR 364, Km 3,5 na cidade de Porto Velho, órgão ligado à Secretaria Estadual de Saúde (SESAU). O Ambulatório Especializado de Hepatites é referência para o Estado de Rondônia, funciona dentro das dependências do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia (CEPEM), órgão da Secretaria Estadual da Saúde do Estado. Foi criado em agosto de 1993 com fins de atendimento, ensino e pesquisa e mantém atendimento diário com 3 profissionais médicos, infectologistas e gastroenterologistas. Até fevereiro/2016 haviam cadastrados 6.442 pacientes em acompanhamento ambulatorial.

4.2 AMOSTRA ESTUDADA

Para validação do método desenvolvido *in house* foram utilizadas amostras de soro de 134 pacientes com infecção crônica pelo HBV, 22 amostras com anti HBc total isolado e 15 amostras com HBsAg indeterminado por ELISA. Um grupo controle de 30 doadores atendidos no Banco de Sangue do Estado de Rondônia (FHEMERON) foi incluído neste estudo, sendo todos negativos para vírus da imunodeficiência humana (HIV) 1 e 2, HBsAg, anti-HBc total e anti-HCV. Também foram testadas 10 amostras de soro de indivíduos cronicamente monoinfectados com HCV e 26 amostras coinfectadas com HBV/HDV.

Para identificação da infecção oculta pelo HBV foram incluídos 150 indivíduos com os seguintes critérios:

Critérios de Inclusão

- Pacientes de ambos os sexos, com idade maior ou igual a 18 anos e menor ou igual a 59 anos;
- Evidência sorológica de infecção pelo vírus B (anti-HBc total positivo) com ausência de evidência de ser portador (HBsAg negativo)
- Ausência do marcador de imunização permanente anti-HBs positivo

Critérios de Exclusão

- Pacientes menores de 18 ou com mais de 59 anos;

- Pacientes grávidas;
- Pacientes indígenas e demais grupos vulneráveis, conforme resolução 196/96- CNS;

4.3 COLETA DE AMOSTRA BIOLÓGICA

Foi obtida uma amostra de 10mL de sangue venoso no laboratório de sorologia de hepatites pelo técnico responsável em tubos estéreis do tipo *vacutainer* sem anticoagulantes. Estas amostras foram incubadas por 30 minutos (min) a temperatura ambiente para retração do coágulo. Após este período as amostras foram centrifugadas por 10 min a 4000 rpm. Em seguida os soros foram distribuídos, em duas alíquotas de 1,5 mL cada e armazenado em freezer -20°C. Uma alíquota foi utilizada para realização dos testes sorológicos e moleculares, a outra armazenada na soroteca para estudos posteriores. O descarte de materiais biológicos e perfuro cortantes obedeceu a norma técnica RDC 306/2004 da ANVISA, que dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde.

As seringas utilizadas para a coleta de sangue foram descartadas imediatamente após o uso em recipientes rígidos, resistentes à punctura, ruptura e vazamento, com tampa, devidamente identificados como substância infectante, atendendo aos parâmetros referenciados na norma NBR 13853/97 da ABNT. As agulhas descartáveis foram desprezadas juntamente com as seringas, sem reencapar ou proceder a sua retirada manualmente. O algodão e o coágulo foram auto clavados e colocados em sacos plásticos do tipo branco leitosos, devidamente identificados como material potencialmente infectante e encaminhados ao lixo hospitalar (armazenamento externo).

4.4 EXTRAÇÃO DO DNA VIRAL

Para a extração do DNA viral foi utilizado o kit comercial *QIAamp DNA mini kit* (Qiagen-USA), onde foi adicionado 20µL de QIAGEN Protease (ou Proteinase K), 200µL da amostra (soro) e 200µL de tampão AL em microtubo de 1,5 mL, o qual foi homogeneizado por 15 segundos e por 10 min incubado a 56°C. Após centrifugado, foi acrescentado 200µL de etanol, em seguida homogeneizado novamente por 15 segundos. O conteúdo foi transferido para coluna de filtragem e centrifugado por 1 min, à uma rotação de 8.000 rpm.

Posteriormente o filtrado foi descartado e adicionado a coluna 500µL do tampão de lavagem AW1 e centrifugado por 3 min à 14.000 rpm. Na sequência o filtrado foi descartado, então adicionado 500µL do tampão de lavagem AW2, centrifugado por 1 min e descartado o filtrado. A coluna foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL. A princípio para otimizar a sensibilidade do teste, três amostras com carga viral conhecida foram eluídas em 200 µL, 100 µL e 50 µL de volume final. A primeira amostra apresentava alta carga viral (3.5×10^5 cópias/mL) e as outras duas com média (2.0×10^3 cópias/mL) e baixa carga viral (8.3×10^0 cópias/mL). Além disso, o DNA foi extraído de 22 amostras de indivíduos com anti-HBc total isolado. Estas amostras foram eluídas em 50 µL e 200 µL e posteriormente quantificados por espectrofotometria através do NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific NanoDrop Products, Wilmington, Delaware) e expresso em ng/µL. Para evitar resultados falso-positivos, rigorosos procedimentos propostos para as técnicas de amplificação do ácido nucléico de diagnóstico foram seguidos (KWOK, 1989).

4.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DO DNA-HBV

4.5.1 Ensaio *In House*

A padronização do método foi realizada por Santos et al., (2010), onde uma curva padrão foi construída a partir do plasmídeo produzido *in house* (pHBVRO). A concentração dos *primers* padronizada foi 300nM e a sonda de hidrólise a 100nM. Na validação foi utilizado o sistema *SYBR® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)*, para testes qualitativos e o sistema *TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)* para testes quantitativos.

4.5.2 Real Time PCR Ultrassensível

O ensaio quantitativo *in house* (qHBV), foi realizado na plataforma ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) com volume de reação de 30µL contendo 15µL *TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)*, 3µL do *primer Forward* HBVRO1 (nt) 5'-AGGAGGCTGTAGGCATAAATTGG-3', 3µL do *primer Reverse* (nt) 5'- GCACAGCTTGGAGGCTTG-3', 0,6µL da sonda FAM 5'-TCACCTCTGCCTAATC-3' MGB, aproximadamente 50ng/µL do DNA extraído e 2,4µL de água.

4.5.3 Ensaios Intra e Inter-Experimentais

Para testar a reprodutibilidade 06 soros positivos para HBV com diferentes cargas virais, foram testados individualmente em duplicata na mesma reação para determinar as variações intra-experimentais. Da mesma forma o mesmo conjunto de amostras foi testado em três experimentos realizados em dias diferentes, para ver as diferenças inter-experimentais na estimativa da carga viral. A reprodutibilidade do método foi estimada pelo cálculo do coeficiente de variação (CV, a relação entre a desvio-padrão e a média das repetições).

4.5.4 Valores HBV-DNA cópias/mL e UI / mL

A calibração dos valores HBV-DNA foi realizada correlacionando com o 1º padrão internacional, estabelecido pela OMS, o OptiQuant® HBV-DNA Quantification Panel, (AcroMetrix Europe B.V.). Especificamente, diluições seriadas do padrão que compõe o kit, com variação de 2×10^2 - 2×10^6 UI/mL. A partir do *pHBVRO*, realizou-se as diluições seriadas, variando de 2×10^3 – 2×10^9 cópias/mL. Com base na regressão linear, a fórmula de conversão foi calculada para as medições *in-house* (cópias / mL) para as unidades de padrão internacional (UI / mL).

4.5.5 Painel de Quantificação

Para comparar o método *in house* (qHBV) com o kit comercial OptiQuant® HBV-DNA Quantification Panel (AcroMetrix® Europe B.V), 134 amostras de soro coletadas de pacientes cronicamente infectados com HBV foram testadas.

4.5.6 Análise Estatística

A correlação da análise gerada entre AcroMetrix kit e ensaio *in house* foi realizada pelo teste de *Pearson*, usando GraphPad 5.0 (GraphPad software). Os valores de carga viral (cópias/mL e IU/mL) foram transformados para a base 10 da função logarítmica. O teste foi realizado pelo software GraphPad Prism 5.0, utilizando intervalo de confiança maior que 95%, com parâmetros de duas caudas para o p valor (*Two tails*).

4.5.7 Especificidade analítica

Para avaliação da especificidade analítica, foram testadas 30 amostras de doadores de sangue, 10 amostras de soro de indivíduos monoinfectados com HCV, 28 amostras

coinfectadas com HBV/HDV e 15 amostras indeterminadas para o antígeno de superfície do HBV junto ao Laboratório de Sorologia do Ambulatório de Hepatites Virais do CEPEM. Todas as amostras foram submetidas ao ensaio quantitativo.

4.5.8 Sensibilidade analítica

Foram selecionadas 15 amostras de soro indeterminados para HBsAg por ELISA. Considerou-se indeterminadas as amostras testadas em duplicatas que apresentaram o valor da absorbância dentro do intervalo de confiança $\pm 10\%$ do valor do *cut-off* (*grey zone*). Para a avaliação do desempenho da detecção, essas amostras foram submetidas à qHBV PCR em duplicatas.

4.6 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA-HBV EM AMOSTRAS DE INDIVÍDUOS ANTI-HBC ISOLADO.

A princípio foi realizada triagem das amostras com anti-HBc total isolado, através de ensaio qualitativo para identificar as amostras positivas para hepatite B oculta. Posteriormente, o DNA-HBV das amostras positivas no ensaio qualitativo, foram quantificadas conforme protocolo padronizado (SANTOS et al., 2014).

4.7 PERFIL DOS PORTADORES DE INFECÇÃO OCULTA.

Foram coletados dados de idade e sexo de todos os portadores de anti-HBc isolado. Além disso, as amostras positivas para infecção oculta foram enviadas para laboratório de análises clínicas para realização da dosagem de transaminases (AST e ALT).

4.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Após apresentação e entrevista com explanação da pesquisa aos convidados, foi assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – anexo I). A pesquisa foi realizada de acordo com os princípios estipulados pela assembleia médica mundial de 1975 e do ministério de saúde (resolução 466/12). Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética institucional do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical - CEPEM com o parecer 29/10 CEP/CEPEM e registro 107/2010.

5 RESULTADOS

5.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO *IN HOUSE*

5.1.1 Eficiência e Sensibilidade analítica

A partir do plasmídeo construído *in house* (pHBVRO), realizou-se as diluições seriadas variando de 2×10^3 - 2×10^9 cópias/mL. O limiar da reação foi ajustado automaticamente nas curvas de amplificação e os dados coletados foram processados para gerar a regressão linear ($R^2 = 0,99$) (Figura 8).

O limite de detecção do ensaio com o padrão pHBVRO padrão foi de 2000 cópias/mL para um volume final de 30uL/reação. Duas amostras positivas com carga viral conhecida foram utilizadas como controle interno da reação. A extração do DNA foi padronizada com eluição de 200uL porque não houve variação significativa na sensibilidade do método em diferentes volumes de amostras com carga viral média e alta.

Porém, das 22 amostras de pacientes com perfil sorológico anti-HBc total isolado, 15 amostras foram negativas no ensaio, 5 amostras foram positivas apenas na eluição de 50uL e 2 amostras foram positivas em ambas eluições. Portanto, a eluição em 50uL é indicada para amostras com baixa carga viral.

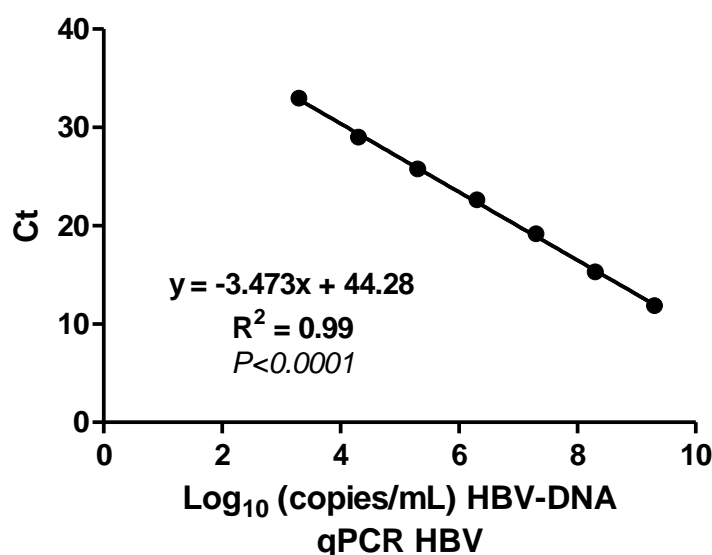


Figura 8- Curva de regressão linear do método qHBV. A partir do plasmídeo construído “*in house*” (pHBVRO), realizou-se as diluições seriadas variando de 2×10^3 - 2×10^9 cópias/mL.

5.1.2 Ensaio de Reprodutibilidade

5.1.2.1 Ensaios inter e intra experimentais

Seis soros testados não apresentaram diferenças entre os valores estatísticos. O coeficiente de variação foi semelhante tanto entre carga viral elevada e baixa (variando entre 0,01 a 0,16%), mostrando a mesma eficiência na amplificação de diferentes quantidades de cópias. Não houve diferença estatística nos coeficientes de variação (CV) entre os intra e inter ensaio, que confirmaram a reprodutibilidade do ensaio (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Teste intra experimental para amostras de soro.

qHBV RO - Intra ensaio						
Amostras	1ª Reação (cópias/mL)	2ª Reação (cópias/mL)	3ª Reação (cópias/mL)	Média Inter ensaio	DP	CV
1	3.5×10^5	3.6×10^5	3.5×10^5	3.5×10^5	0.02×10^5	0,01
2	1.2×10^3	1.2×10^3	1.2×10^3	1.2×10^3	0.01×10^3	0,01
3	1.4×10^1	1.2×10^1	1.3×10^1	1.3×10^1	0.11×10^1	0,09
4	9.0×10^0	8.0×10^0	7.6×10^0	8.2×10^0	0.80×10^0	0,10
5	1.9×10^4	1.8×10^4	1.7×10^4	1.8×10^4	0.10×10^4	0,06
6	2.2×10^3	1.9×10^3	2.0×10^3	2.0×10^3	0.19×10^3	0,10

Tabela 2. Teste inter experimental para amostras de soro.

qHBV RO - Inter ensaio						
Amostras	1ª Reação (cópias/mL)	2ª Reação (cópias/mL)	3ª Reação (cópias/mL)	Média do inter ensaio	DP	CV
1	3.6×10^5	3.9×10^5	3.5×10^5	3.7×10^5	0.18×10^5	0,05
2	1.2×10^3	1.5×10^3	1.2×10^3	1.2×10^3	0.21×10^3	0,16
3	1.2×10^1	1.3×10^1	1.2×10^1	1.2×10^1	0.09×10^1	0,08
4	9.0×10^0	7.5×10^0	8.4×10^0	8.3×10^0	0.74×10^0	0,09
5	1.9×10^4	1.7×10^4	1.6×10^4	1.7×10^4	0.15×10^4	0,08
6	2.3×10^3	2.3×10^3	1.8×10^3	2.2×10^3	0.27×10^3	0,12

5.1.3 Validação do método qHBV

Utilizou-se uma equação para determinar que o teste desenvolvido *in house* (qHBV) apresenta forte correlação com o kit *Acrometrix*® *HBV-DNA* ($R^2=0,998$ e $p<0,0001$), tal como mostrado na Figura 9.

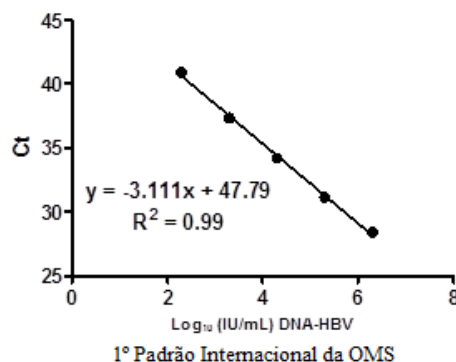


Figura 9- Regressão linear do primeiro padrão preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), HBV® kit AcroMetrix DNA.

Os valores das cargas virais dos 134 pacientes foram analisados em log₁₀ qHBV IU/mL vs 1º Padrão Internacional da OMS (kit Acrometrix® HBV-DNA) através da equação de Person. O $R^2 = 0,99$ e $p<0,0001$ demonstra a forte correlação dos dados. Conforme a regressão linear: $[\text{Log}(\text{IU/ml}) = 0.9038 \text{Log } 10 (\text{cópias/mL}) - 1.0643]$, sugerindo que $1 \text{ IU/mL} = 15 \text{ cópias/mL}$ (Figura 10).

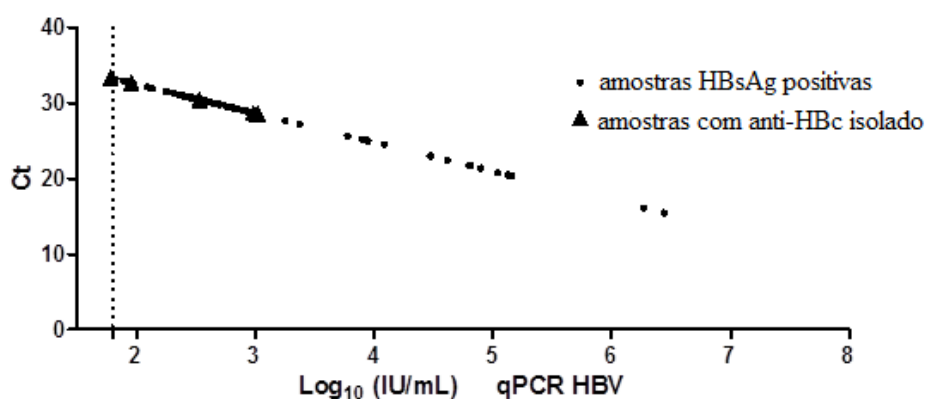


Figura 10- A sensibilidade analítica de qHBV A sensibilidade analítica de qHBV- das 134 amostras de portadores crônicos, 91 foram positivas no ensaio. E das 22 amostras com anti-HBc isolado, 5 foram positivas no qHBV. A linha pontilhada representa o limite de sensibilidade analítica do qHBV.

5.1.4 Especificidade analítica e desempenho da detecção de amostras indeterminadas

As amostras indeterminadas foram testadas em duplicatas em três experimentos, onde 6 foram positivas para HBV DNA pelos dois métodos (Tabela 3). Todas as amostras negativas se confirmaram permanecendo em níveis indetectáveis, abaixo do limite de detecção. Das 22 amostras com anti-HBc isolado, 5 foram positivas (Figura 11).

Tabela 3. Análise dos dados de amostras indeterminadas.

	1 ^a Reação	2 ^a Reação	3 ^a Reação	Média inter- reações	SD	CV	Log ₁₀ IU/mL	DO	Cut-off
1	37,31	37,56	37,74	37,54	0,21595	1%	2,3	0,086	0,062
2	38,90	38,98	39,1	38,99	0,10066	0%	1,8	0,075	0,079
3	38,69	38,83	38,95	38,82	0,13013	0%	2,5	0,070	0,063
4	37,47	37,54	37,87	37,63	0,21362	1%	1,9	0,062	0,065
5	39,05	39,1	39,45	39,20	0,21794	1%	1,8	0,060	0,068
6	38,94	39,03	39,26	39,08	0,16503	0%	1,8	0,069	0,068

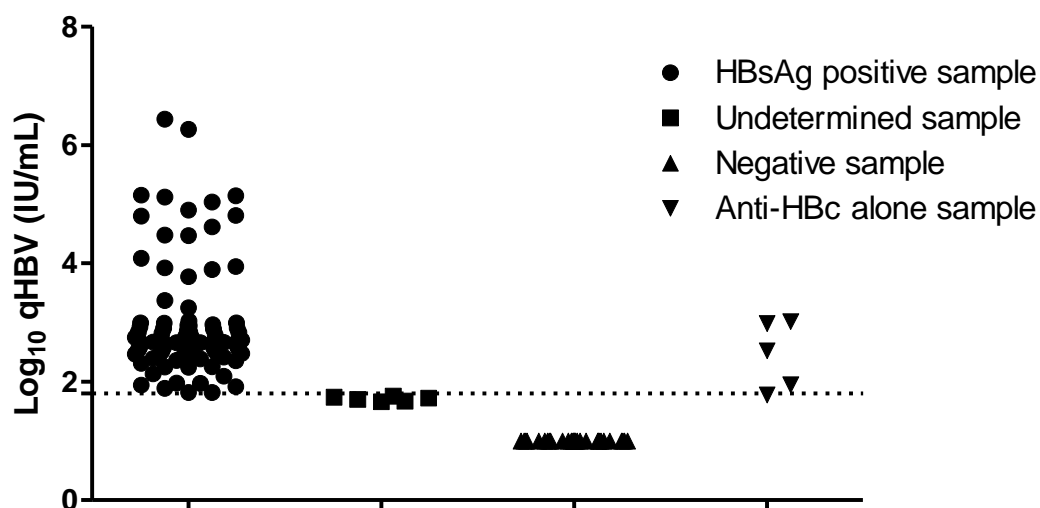


Figura 11- Especificidade analítica- As amostras que com resultados positivo, indeterminado, negativo e anti-HBc isolado por ELISA, foram testadas utilizando qPCR HBV. Todas as amostras negativas se confirmaram permanecendo em níveis indetectáveis, abaixo do limite de detecção, Das 22 amostras com anti-HBc isolado, 5 foram positivas.

5.2 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA-HBV EM AMOSTRAS DE INDIVÍDUOS ANTI-HBc ISOLADO.

5.2.1 Triagem do DNA-HBV por PCR em tempo real

No período de 2013 e 2014 foram selecionados 150 indivíduos com perfil sorológico de anti-HBc isolado. Posteriormente, foi realizada a triagem das amostras por PCR em tempo real qualitativo para identificação do DNA-HBV (Figura 12). Com base nos resultados observou-se que 108 (72%) foram negativas e 42 (28%) positivas, conforme representado na figura 13.

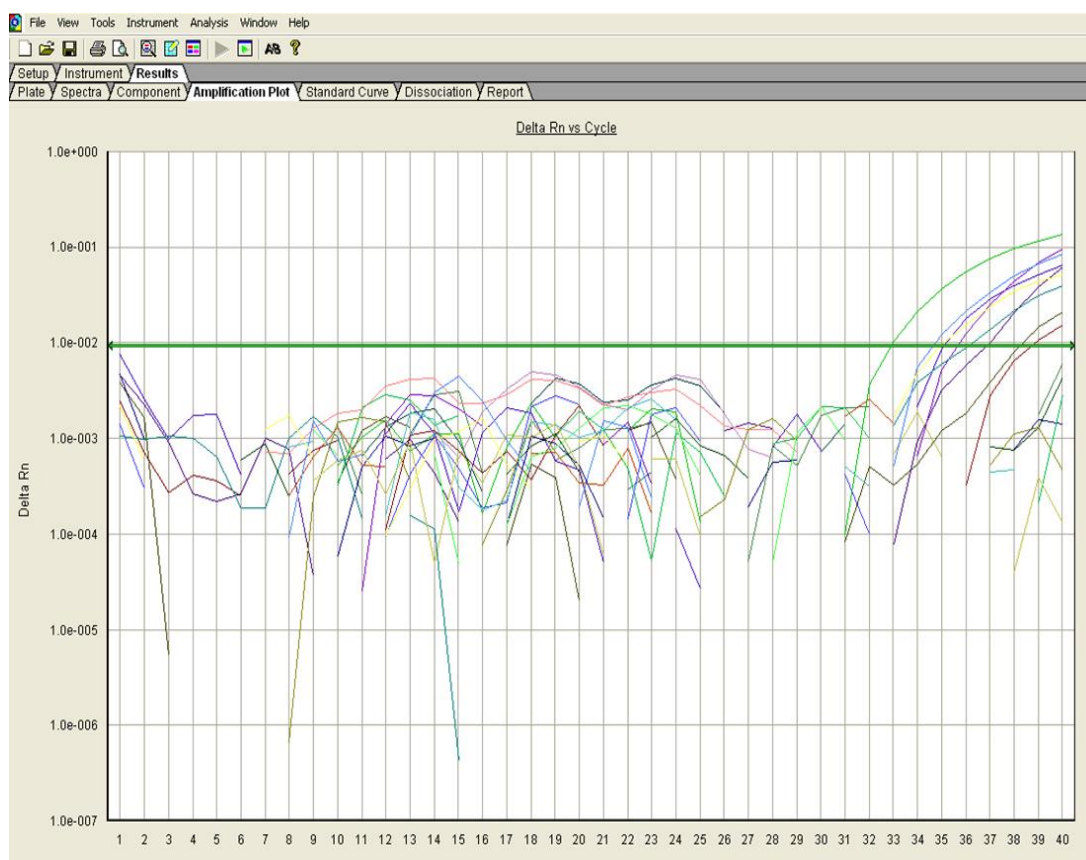


Figura 12- Triagem das amostras com anti-HBc isolado por PCR em tempo real. Triagem das amostras com anti-HBc isolado por PCR em tempo real. Representa 24 amostras submetidas a triagem por PCR em tempo real, onde 7 foram positivas mais 2 controles positivos observadas pela curva de amplificação.

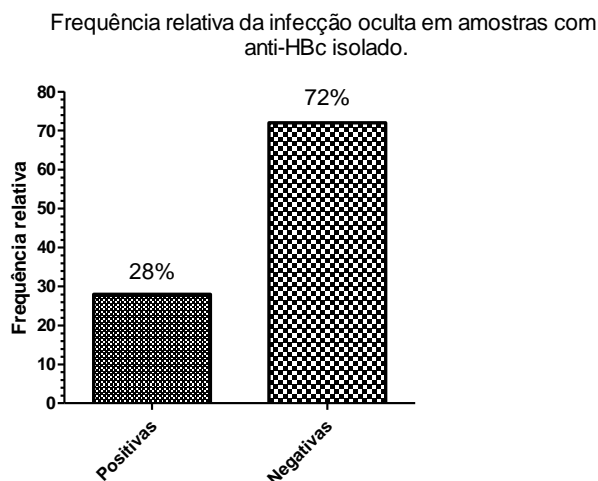


Figura 13- Frequência de infecção oculta em amostras com anti-HBc isolado. Das 150 amostras analisadas 72% (108/150) foram negativas e 28% (42/150) foram positivas.

5.2.2 Quantificação da carga viral do HBV

Posteriormente as amostras positivas para DNA-HBV foram submetidas a quantificação da carga viral, conforme mostrado na Figura 14.

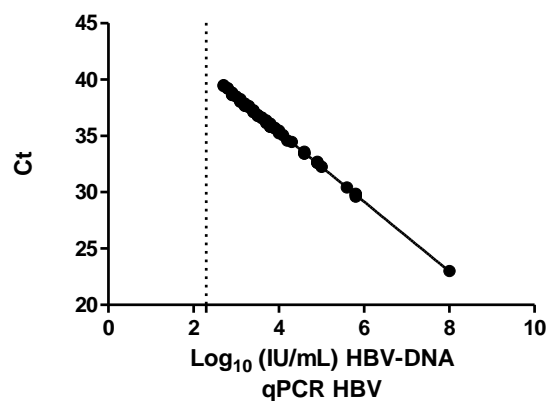


Figura 14- Quantificação do DNA-HBV- as 42 amostras identificadas com hepatite B oculta. As amostras identificadas com infecção oculta foram submetidas a quantificação da carga viral (Log₁₀ IU/mL). A linha tracejada representa o limite de detecção inferior do ensaio quantitativo de DNA-HBV (2.11 Log₁₀ ou 2×10^3 cópias/mL). A determinação da carga viral das amostras de soro foi realizada conforme Santos et al, 2014.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL CLÍNICO

5.3.1 Caracterização do perfil clínico

Foi observado que dos 150 indivíduos com anti-HBc isolado 61% (91/150) são do sexo masculino e 49% (59/150) do sexo feminino (Figura 15). Em relação a idade a média encontrada foi de 45 anos, a mediana 26 e moda 32 anos. As amostras positivas para infecção oculta foram enviadas para laboratório de análises clínicas para realização da dosagem de transaminases (AST e ALT), não foi observado resultados representativos de dano hepático (Figura 16).

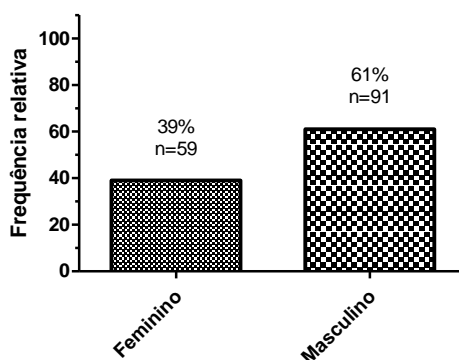


Figura 15- Análise da frequência relativa em relação ao sexo. Dos 150 indivíduos selecionados com anti-HBc isolado. Deste total 61% (91/150) são do sexo masculino e 49% (59/150) do sexo feminino.

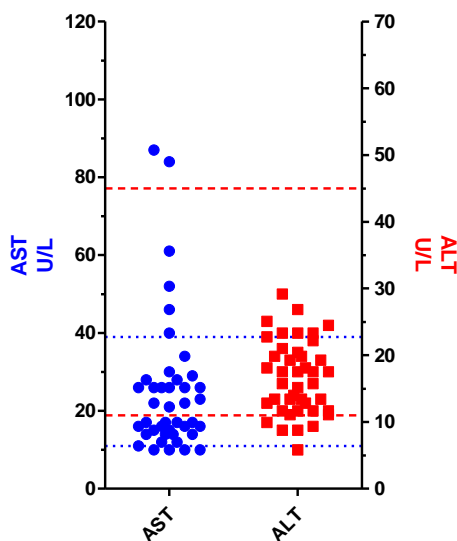


Figura 16- Análise do perfil bioquímico das 42 amostras com infecção oculta. Na esquerda, em azul a representação da dosagem de AST (aspartato aminotransferase), os valores de referência estão ilustrados em pontilhados. A direita, em vermelho a representação da dosagem de ALT (alanina aminotransferase), os valores de referência estão ilustrados em tracejados.

6 DISCUSSÃO

A infecção oculta pelo HBV é definida como a presença de DNA-HBV no fígado (com ou sem DNA HBV no soro), em indivíduos negativos para antígeno de superfície do HBV (HBsAg). Dependendo dos anticorpos detectados, a infecção oculta pode ser classificada em soropositivo (anti-HBc e / ou anti-HBs positivo) ou soronegativo (anti-HBc e anti-HBs negativo) (RAIMONDO, 2008). Atualmente o HBV continua sendo um fator de risco importante na transmissão da infecção durante a transfusão sanguínea, isso devido ao período de janela de soroconversão, infecção por imunovariantes virais e a presença de infecção oculta pelo HBV (MENDES, 2006; CADOTTI, 2009; XIAO X, 2012).

A triagem sorológica utilizando a detecção combinada do HBsAg e do anti-HBc, constitui-se em importante estratégia na triagem e exclusão de doadores na grande maioria das hepatites B ocultas (ALLAIN; CADOTTI, 2007; KEYVANI, 2013). Principalmente, em diversos países com áreas de baixa prevalência para o HBV(< 3%) - mostrando-se ineficiente sobretudo em situações de janela imunológica (GONÇALES JR. F.L. , 2004; FANG C.T., 2006; ALLAIN; CADOTTI, 2007). Entretanto, em países com elevada prevalência de positividade para o anti-HBc total, a utilização deste marcador poderia implicar na exclusão de vários potenciais doadores. Levando a uma diminuição de hemoderivados em várias regiões ou também na falha em bloquear eventuais doadores com hepatite B oculta, mantendo presente o risco de infecção pós-transfusional pelo HBV (LIU C.J., 2006; CHAKRABARTI, 2012).

O método qHBV representa uma excelente alternativa, pois, combina a capacidade de reduzir significativamente o risco de transmissão durante o período de janela e a detecção do HBV oculto. Neste estudo um método de PCR real time *in-house* ultrasensível foi validado, para identificação e quantificação do DNA-HBV, sendo que o desempenho do qHBV apresentou uma eficiência de 94.06% e alta correlação com o 1º padrão internacional estabelecido pela OMS (kit Acrometrix ® HBV-DNA), $r = 0,998$, $p < 0,0001$.

A metodologia desenvolvida também demonstrou ser mais sensível do que outras metodologias de PCRs quantitativas desenvolvidas *in house* (PARASKEVIS, 2002; KAVITA, 2006; PARASKEVIS, 2010) e especificidade para discernir hepatite B oculta e casos indeterminados por ELISA, mesmo utilizando apenas 200µl de soro para extração

do DNA viral e 6µl de extração do DNA viral em 30µl de volume final para a qHBV. No entanto, foi observado que nos casos de amostras com baixa carga viral, é importante considerar um volume menor na eluição do DNA.

É o caso das 22 amostras de indivíduos com anti-HBc total isolado testadas neste estudo, em que 5 foram positivos em 50 µL de eluição e apenas 2 foram positivos quando eluídas em 200µl. Estes resultados reforçam a importância que no caso de infecção oculta ou período de janela imunológica, a concentração do DNA é um fator importante a considerar. A alta especificidade analítica do teste demonstrada utilizando amostras de indivíduos positivos, negativos e indeterminados para o HBsAg por ELISA, sugerem que a qHBV pode detectar o DNA-HBV em indivíduos com hepatite B em qualquer fase da doença, credenciando-o como um importante método para testes de ácidos nucleicos (NAT).

A reprodutibilidade do qHBVRO foi avaliada através dos ensaios intra e inter-experimental apresentando um coeficiente variação entre 0 a 1% indicando uma boa reprodutibilidade. Quando comparado com outros testes desenvolvidos *in house* para detecção e quantificação do HBV as variações são reportadas entre 4,94% e 10,59%, valores já considerados como bom resultado de reprodutibilidade (PARASKEVIS et al., 2002; LOLE E ARANKALLE, 2006; TANI, 2012). O método validado foi considerado eficiente, sensível, específico e reprodutível para detecção de hepatite B oculta, e poderia ser utilizado para NAT em bancos de sangue, devido a sua elevada sensibilidade analítica, visando evitar a transmissão de HBV através da transfusão de sangue.

O anti-HBc isolado é o segundo mais frequente em infecção pelo HBV, ocorrendo em cerca de 30% de pacientes infectados por HBV (PIROTH, 2002; SANTOS, 2003; SHIRE, 2004), prevalecendo em primeiro lugar o perfil que caracteriza o portador crônico pela presença do HBsAg (SHIRE, 2004). Este perfil sorológico pode significar um resultado falso positivo, fase de janela imunológica de uma infecção aguda, imunidade de fase final com uma queda nos níveis séricos de anticorpos anti-HBs, infecção oculta confirmada por DNA-HBV detectável pelo teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) ou possível presença de HBsAg mutantes (RAIMONDO, 2013).

Neste estudo, das 150 amostras submetidas a triagem, 42 (28%) revelaram-se positivas para DNA-HBV. Esses dados não diferem dos resultados encontrados em

estudos semelhantes, onde são relatadas taxas que variam entre 19 a 30% (BRÉCHOT, 2001; RAMEZANI, 2010). A prevalência de hepatite B oculta em diferentes estudos apresenta variação entre 1% a 90%. Segundo os autores, essa grande divergência em diferentes áreas geográficas é influenciada por uma série de fatores que inclui endemicidade pelo HBV, doenças do fígado e as técnicas de detecção do genoma do HBV (TORBENSON, 2002; SAMAL J, 2012; RIOS-OCAMPO, 2014).

Todos os indivíduos incluídos nessa análise apresentam em comum, o anti-HBc positivo como único marcador sorológico para infecção pelo HBV, vários autores consideram esse anticorpo como indicativo de hepatite B oculta (HOFER, 1998; BRÉCHOT, 2001; PIROTH, 2002; SHIRE, 2004, GERLICH, 2013). Segundo Rios-Ocampo (2014) 80% dos portadores de infecção oculta apresentam anti-HBc isolado. Além disso o DNA-HBV é mais frequentemente identificado na ausência de anti-HBs (RAIMONDO, 2008).

Recentemente Oluyinka et al (2015), relataram a prevalência de infecção oculta em diferentes áreas geográficas, segundo os dados, na Coreia a prevalência foi de 0,7%, no Canadá em indivíduos com infecção resolvida pelo HBV a porcentagem foi de 18% e 8% em indivíduos soronegativos (HBsAg, anti-HBs e anti-HBc). O estudo faz referência também a variação de acordo com a população de estudo, assim em pacientes transplantados de fígado a prevalência foi de 64%, 62% em pacientes com hepatocarcinoma (CHC), 27% em pacientes em hemodiálise e 45% em portadores coinfectados com HCV e HIV.

A prevalência de 28% reportada no atual estudo é bastante elevada, porém deve ser considerado que a Amazônia Ocidental é uma das regiões mais endêmicas no mundo, para essa infecção e suas consequências (BRAGA, 2001).

No Brasil alguns estudos evidenciam a prevalência de hepatite B oculta. Moresco et al. (2014) identificaram entre 3600 doadores de sangue no estado do Amazonas a positividade para anti-HBc em 799 (22,2%) casos, 291 dessas amostras foram submetidas a PCR em tempo real, sendo o DNA-HBV identificado em 8 (2,7%).

Em Minas Gerais, Ferrari et al. (2014) relataram a prevalência de 4,4% (3) em 68 pacientes cirróticos submetidos a transplante de fígado. Em estudo realizado por Barros Júnior et al. (2008), foi avaliada a ocorrência de infecção oculta pelo HBV em pacientes da Amazônia brasileira, relatado como primeiro estudo relacionado a infecção oculta. Os autores observaram, dentre 51 pacientes com anti-HBc total positivos que foram testados

usando a reação em cadeia da polimerase, 17% foram positivos, o autor relata que por ser uma região endêmica a prevalência foi baixa. Porém, destaca que a sensibilidade da PCR poderia ter sido melhorada, utilizando fragmentos menores do que 600pb amplificados, considerando a recomendação de fragmentos pequenos para diagnóstico (CHEMIN, 2001). Além disso, no estudo foi amplificado a região S, enquanto estudos observaram melhor detecção amplificado as regiões da polimerase, core e X do genoma viral (BRÉCHOT, 2001; CONJEEVARAM, 2001).

Como já mencionado, um dos fatores mais importantes na detecção de infecção oculta, é a sensibilidade da técnica utilizada no rastreio do DNA-HBV. Barros et al. (2008), utilizaram o sistema de *semi-nested* PCR, nesse estudo foi aplicado na triagem do DNA-HBV um método de PCR em tempo real (qHBV) que mostrou ser 100 vezes mais sensível do limite de detecção do primeiro padrão internacional da OMS (kit AcroMetrix® HBV-DNA), uma vez que permite a detecção de até 2000 cópias de vírus por mL de soro em indivíduos infectados com HBV.

A identificação e quantificação das amostras com hepatite B oculta, possibilitaram uma importante etapa da padronização do método de quantificação padronizado. Considerando que permitiu avaliar a detecção do DNA-HBV em títulos virais extremamente baixos, considerado uma janela crítica para identificação precisa do HBV (SANTOS et al, 2014). Segundo Raimondo (2008) o padrão ouro para o diagnóstico da OBI tornou-se possível por meio de técnicas de biologia molecular altamente sensíveis e específicas para o HBV, como os NAT, uma técnica de PCR em tempo real com limites de detecção <10 cópias DNA-HBV por reação.

Os dados apresentados relacionados ao perfil dos indivíduos com anti-HBc isolado, sugerem que este padrão sorológico é relativamente comum, independentemente da idade e sexo, onde dos 150 indivíduos selecionados 61% (91/150) são do sexo masculino e 49% (59/150) do sexo feminino, com moda 32 anos de idade, assim como relatado na literatura (ALLAIN, 2009; RAMEZANI, 2010).

Nos dados da dosagem das transaminases, foi observado um paciente com perfil alterado, sugerindo possível lesão hepática. Em estudo realizado por Zerbine et al (2008), propõe-se diferentes mecanismos de controle da replicação viral em infecções ocultas soropositivas e soronegativas. Nesse estudo os autores relatam que existem dois perfis de resposta de células T específicas para o HBV, definidas pela presença ou ausência de marcadores sorológicos assim: pacientes com infecção oculta com anti-HBc positivo

mostraram uma resposta de células T de memória típico de proteção, esta condição sugere uma infecção resolvida com controle de vírus imuno mediada. Em contraste, as células T específicas em pacientes anti-HBc negativas não expandem e nem produzem interferon- γ *in vitro* rapidamente, o que sugere a possibilidade de uma infecção baixa com carga viral insuficiente para permitir memória imunológica. Supõe-se que isso justificaria a presença elevada das enzimas hepáticas em alguns casos. Porém na maioria dos casos não foi observado alteração das transaminases. De acordo com Minuk (2005), resultados de idade, sexo e bioquímica do fígado não ajudam a distinguir casos de infecção oculta pelo HBV. Contudo, estudos adicionais são necessários para compreender as possíveis implicações clínicas.

Nas últimas décadas, emergentes evidências do potencial de complicações clínica da hepatite B oculta são responsáveis pelo crescente interesse nesse assunto. Dessa forma, as implicações clínicas envolvem diferentes aspectos, primeiramente, a hepatite B oculta abriga potencial risco de transmissão do HBV por transfusão de sangue, hemodiálise e transplante de órgãos (HU, 2002; ZOBEIRI, 2013; MORESCO, 2014).

Portanto, deve-se considerar que portadores de hepatite B oculta são potencial fonte de transmissão do HBV nos casos de transfusão de sangue, hemoderivados e transplante de órgão (principalmente fígado) (HOLLINGER et al., 2010; ALLAIN et al., 2011; STRAMER et al., 2011). A realização de teste de ácidos nucleicos (NAT) para HBV representa uma excelente opção de prevenção nestes casos, pois, combina a capacidade de reduzir significativamente o risco de transmissão, durante o período de janela e a detecção do HBV oculto.

Outros estudos sugerem que a hepatite B oculta pode ser responsável pela exacerbação da hepatite C, interferir na resposta terapêutica e progressão para cirrose e / ou carcinoma hepatocelular (HU, 2002; SHIRE et al., 2007; LEVAST et al., 2010; RAMEZANI et al., 2010; SQUADRITO, 2014). Em estudo realizado por Wong (2011), com objetivo de investigar incidência de hepatite B oculta em pacientes com hepatocarcinoma, observou-se positividade em 73% dos pacientes com HCC criptogênico e 17% em pacientes com HCC infectados pelo HCV. Assim, a infecção oculta pelo HBV pode favorecer ou acelerar a progressão para cirrose, associado com formas mais graves da doença hepática (ZOBEIRI, 2013). Propõe-se que a patogênese dessa infecção resulte de um processo multifatorial, envolvendo aspectos virais e do hospedeiro, incluindo

mutações no genoma viral e forte supressão da replicação e expressão gênica do HBV (POLLICINO, 2007; RAMEZANI, 2010; SAMAL, 2012).

Portanto, diante dos dados da OMS, cerca de um terço da população do mundo têm evidência sorológica de infecção pelo HBV passada ou presente. Muitos desses indivíduos podem atuar como reservatório e transportar o vírus por vários anos após a recuperação da hepatite B aguda sem mostrar nenhuma evidência sorológica, clínica ou bioquímica de doença hepática (URBANI, 2010). É notória a importância dos estudos relacionados com hepatite B oculta, isso é comprovado pelo considerável e contínuo número de trabalhos publicados em revistas científicas nas últimas décadas, que cobrem diferentes áreas de interesse.

Portanto, este é o segundo estudo relacionado a infecção oculta na Amazônia Ocidental, porém, mais estudos são necessários para melhor elucidação do perfil sorológico do indivíduo com anti-HBc total isolado e sua implicação do desenvolvimento de infecção oculta. Apesar da utilização do NAT na rotina laboratorial, ser bastante discutida, devido aos custos e eficácia de diagnóstico sorológico. Sugerimos a aplicação do qHBV para realizar estudos com infecções ocultas, para confirmar a viremia, para triagem de doadores de sangue e de órgãos, discriminar pacientes com infecção crônica daqueles com infecção aguda resolvida, diagnosticar a infecção em neonatos de mães portadoras do HBV, resolver resultados sorológicos indeterminados, monitorar pacientes em terapia antiviral e identificar o vírus em indivíduos imunocomprometidos.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, o método de PCR em tempo real para quantificação do DNA-HBV validado, é indicado para a identificação e quantificação de amostras de soro com baixa carga viral. O método de extração de DNA foi otimizado e apresenta sensibilidade satisfatória na identificação de amostras com hepatite B oculta.

Para validação do ensaio foi utilizado o ® kit AcroMetrix HBV, para avaliar o desempenho analítico, conforme preconizado pela OMS. Os dados revelam forte correlação entre os métodos, nos processos moleculares de diagnóstico para a determinação quantitativa e qualitativa do DNA-HBV.

A frequência de hepatite B oculta relatada neste estudo, reforça a importância da aplicação de NAT em indivíduos com perfil sorológico de anti-HBc isolado, considerando os potenciais reservatórios de HBV que essas pessoas representam. Além disso, foi observado que dados como idade, sexo e bioquímica do fígado não ajudam a distinguir casos de infecção oculta pelo HBV.

Portanto, as análises realizadas permitem considerar o qHBV como um método reprodutível, sensível e específico. Isso possibilita um diagnóstico preciso, em qualquer fase da doença, podendo ser utilizado principalmente, como importante ferramenta na triagem de NAT para hepatite B oculta em doadores de sangue e órgãos, aumentando a segurança dos pacientes.

8 REFERÊNCIAS

AKUTA, N. et al. Virological and biochemical relapse after discontinuation of lamivudine monotherapy for chronic hepatitis B in Japan: comparison with breakthrough hepatitis during long-term treatment. **Intervirol**, v. 48, n. 2-3, p. 174-82, 2005.

ALLAIN, J. P.; CANDOTTI, D. Diagnostic algorithm for HBV safe transfusion. **Blood Transfus**, v. 7, n. 3, p. 174-82, Jul 2009. ISSN 1723-2007.

ALMEIDA, A. M. et al. [Efficacy of interferon (conventional, pegylated) and lamivudine for treatment of chronic hepatitis B: a systematic review]. **Cad Saude Publica**, v. 25, n. 8, p. 1667-77, Aug 2009.

ALTER, M. J. Epidemiology and prevention of hepatitis B. **Semin Liver Dis**, v. 23, n. 1, p. 39-46, Feb 2003.

ARAUZ-RUIZ, P. et al. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. **J Gen Virol**, v. 83, n. Pt 8, p. 2059-73, Aug 2002.

ARAUZ-RUIZ, P. et al. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Central America reflected in the genetic variability of the small S gene. **J Infect Dis**, v. 176, n. 4, p. 851-8, Oct 1997.

BARROS, L. M. et al. High prevalence of hepatitis B virus subgenotypes A1 and D4 in Maranhao state, Northeast Brazil. **Infect Genet Evol**, v. 24, p. 68-75, Jun 2014.

BARROS JUNIOR, G. M. et al. [Occult hepatitis B: prevalence and clinical characteristics in a population with high endemicity of hepatitis B infection in the western Brazilian Amazon region]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, n. 6, p. 596-601, Nov-Dec 2008.

BARTHOLOMEUSZ, A.; SCHAEFER, S. Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. **Rev Med Virol**, v. 14, n. 1, p. 3-16, Jan-Feb 2004.

BLENDIS, L.; LURIE, Y.; OREN, R. Occult HBV infection--both hidden and mysterious. **Gastroenterology**, v. 125, n. 6, p. 1903-5, Dec 2003.

BLITZ, L. et al. Antigenic diversity of hepatitis B virus strains of genotype F in Amerindians and other population groups from Venezuela. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 3, p. 648-51, Mar 1998.

BLUMBERG, B. S.; ALTER, H. J.; VISNICH, S. A "New" Antigen in Leukemia Sera. **JAMA**, v. 191, p. 541-6, Feb 15 1965.

BOWYER, S. M. et al. A unique segment of the hepatitis B virus group A genotype identified in isolates from South Africa. **J Gen Virol**, v. 78 (Pt 7), p. 1719-29, Jul 1997.

BRAGA, W. S. et al. [The occurrence of hepatitis B and delta virus infection within seven Amerindian ethnic groups in the Brazilian western Amazon]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 34, n. 4, p. 349-55, Jul-Aug 2001.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. A B C D E do Diagnóstico para as Hepatites Virais. p. 24; 1º. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Hepatites virais: o Brasil está atento. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Hepatite Viral Crônica B e Coinfecções. 1a . ed. Brasília: Ministerio da Saúde, 2011.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE: Boletim Epidemiológico- Hepatites Virais. Brasília-DF, 2012.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE: **Departamento de DST, Aids e Hepatites virais**. Disponível em: < <http://www.aids.gov.br/pagina/hepatite-b>> Acesso em: 10 de set.. 2015.

BRAVO, A. A.; SHETH, S. G.; CHOPRA, S. Liver biopsy. **N Engl J Med**, v. 344, n. 7, p. 495-500, Feb 15 2001.

BRECHOT, C. et al. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely "occult"? **Hepatology**, v. 34, n. 1, p. 194-203, Jul 2001.

BOTELHO-SOUZA, L. F. et al. Development of a reverse transcription quantitative real-time PCR-based system for rapid detection and quantitation of hepatitis delta virus in the western Amazon region of Brazil. **J Virol Methods**, v. 197, p. 19-24, Mar 2014.

CABRERIZO, M. et al. Molecular analysis of hepatitis B virus DNA in serum and peripheral blood mononuclear cells from hepatitis B surface antigen-negative cases. **Hepatology**, v. 32, n. 1, p. 116-23, Jul 2000.

CDC: Centers for Disease Control and Prevention Update: expanded availability of thimerosal preservative: free hepatitis B **vaccine**. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2000;49:642-51.

CDC: Centers for Disease Control and Prevention, Guidelines for Viral Hepatitis Surveillance and Case Management. Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations and Reports. June 2002: 1-43.

CDC. Recommendations and reports. Prevention and control of infections with hepatitis virus in correctional settings. Morbidity and Mortality Weekly Report 2003; 52:1.

CANDOTTI, D.; ALLAIN, J. P. Transfusion-transmitted hepatitis B virus infection. **J Hepatol**, v. 51, n. 4, p. 798-809, Oct 2009.

CHAVEZ, J. H.; CAMPANA, S. G.; HAAS, P. [An overview of hepatitis B in Brazil and in the state of Santa Catarina]. **Rev Panam Salud Publica**, v. 14, n. 2, p. 91-6, Aug 2003.

CHEMIN, I. et al. Role of silent hepatitis B virus in chronic hepatitis B surface antigen(-) liver disease. **Antiviral Res**, v. 52, n. 2, p. 117-23, Nov 2001.

CHEMIN, I. et al. Close monitoring of serum HBV DNA levels and liver enzymes levels is most useful in the management of patients with occult HBV infection. **J Hepatol**, v. 51, n. 4, p. 824-5, Oct 2009.

CHEMIN, I.; TREPO, C. Clinical impact of occult HBV infections. **J Clin Virol**, v. 34 Suppl 1, p. S15-21, Dec 2005.

CHOTIYAPUTTA, W.; LOK, A. S. Hepatitis B virus variants. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 6, n. 8, p. 453-62, Aug 2009.

CHU, C. J.; HUSSAIN, M.; LOK, A. S. Hepatitis B virus genotype B is associated with earlier HBeAg seroconversion compared with hepatitis B virus genotype C. **Gastroenterology**, v. 122, n. 7, p. 1756-62, Jun 2002.

CONJEEVARAM, H. S.; LOK, A. S. Occult hepatitis B virus infection: a hidden menace? **Hepatology**, v. 34, n. 1, p. 204-6, Jul 2001.

DAS, A.; MAINI, M. K. Innate and adaptive immune responses in hepatitis B virus infection. **Dig Dis**, v. 28, n. 1, p. 126-32, 2010.

DIENSTAG, J. L. et al. A preliminary trial of lamivudine for chronic hepatitis B infection. **N Engl J Med**, v. 333, n. 25, p. 1657-61, Dec 21 1995.

DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC Evol Biol**, v. 7, p. 214, 2007.

DUNN, C. et al. Temporal analysis of early immune responses in patients with acute hepatitis B virus infection. **Gastroenterology**, v. 137, n. 4, p. 1289-300, Oct 2009.

FELD, J. J.; HEATHCOTE, E. J. Hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B: natural history and treatment. **Semin Liver Dis**, v. 26, n. 2, p. 116-29, May 2006.

FERRAZ, M. L. et al. Epidemiology of acute hepatitis B in a university hospital in Sao Paulo, Brazil: retrospective study of two five-year periods. **Sao Paulo Med J**, v. 116, n. 3, p. 1695-9, May-Jun 1998.

FERREIRA, M. S. [Diagnosis and treatment of hepatitis B]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 33, n. 4, p. 389-400, Jul-Aug 2000.

FERRARI, T. C. et al. Occult hepatitis B virus infection in liver transplant patients in a Brazilian referral center. **Braz J Med Biol Res**, v. 47, n. 11, p. 990-4, Nov 2014.

FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields' Virology**. 5th. ed. [s.l.] Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

FOCACCIA, R. **Tratado de hepatites virais**. São Paulo. Editora Atheneu. 119-192, 2003.

FONSECA, J. C. [Natural history of chronic hepatitis B]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, n. 6, p. 672-7, Nov-Dec 2007.

FONSECA, J. C. [History of viral hepatitis]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 3, p. 322-30, May-Jun 2010.

GANEM, D.; PRINCE, A. M. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. **N Engl J Med**, v. 350, n. 11, p. 1118-29, Mar 11 2004.

GARCIA, P. D. et al. Targeting of the hepatitis B virus precore protein to the endoplasmic reticulum membrane: after signal peptide cleavage translocation can be aborted and the product released into the cytoplasm. **J Cell Biol**, v. 106, n. 4, p. 1093-104, Apr 1988.

GERLICH, W. H. Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now. **Virol J**, v. 10, p. 239, 2013.

GISH, R. G.; LOCARNINI, S. A. Chronic hepatitis B: current testing strategies. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 4, n. 6, p. 666-76, Jun 2006.

GOMES, MICHELE MESQUITA SOARES. *Caracterização de genomas completos do vírus da hepatite B de diferentes genótipos isolados no Brasil*. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo. 2005.

GONCALES JUNIOR, F. L. et al. Elevated alanine aminotransferase (ALT) in blood donors: an assessment of the main associated conditions and its relationship to the development of hepatitis C. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 40, n. 4, p. 219-24, Jul-Aug 1998.

GONÇALES JUNIOR FL História Natural da Infecção. Apresentação Clínica. Complicações. In: Focaccia R. **Tratado de Hepatites Virais**. São Paulo: Atheneu; p.141-149, 2003.

GONÇALES NSL, CAVALHEIRO NP. Marcadores sorológicos da hepatite B e sua interpretação. **Braz J Infect Dis** 10Suppl1: 19-22, 2006.

GONÇALVES JUNIOR, F. L. Hepatite por Vírus B: História Natural da Infecção. In: **Tratado de Hepatites Virais e Doenças Associadas**. 3o . ed. São Paulo: Editora Atheneu. p. 327–339, 2013.

HATZAKIS, A.; MAGIORKINIS, E.; HAIDA, C. HBV virological assessment. **J Hepatol**, v. 44, n. 1 Suppl, p. S71-6, 2006.

HOOFNAGLE, J. H. Challenges in therapy of chronic hepatitis B. **J Hepatol**, v. 39 Suppl 1, p. S230-5, 2003.

HOOFNAGLE, J. H.; DI BISCEGLIE, A. M. Serologic diagnosis of acute and chronic viral hepatitis. **Semin Liver Dis**, v. 11, n. 2, p. 73-83, May 1991.

HOFER, M. et al. Frequent chronic hepatitis B virus infection in HIV-infected patients positive for antibody to hepatitis B core antigen only. Swiss HIV Cohort Study. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 17, n. 1, p. 6-13, Jan 1998.

HOLLINGER F. B. The five viruses: a perspective. AASLD Postgraduate Course “Viral hepatitis A to F: An Update; p 2-20, 1994.

HOLLINGER, F. B.; SOOD, G. Occult hepatitis B virus infection: a covert operation. **J Viral Hepat**, v. 17, n. 1, p. 1-15, Jan 2010.

HOU, J.; LIU, Z.; GU, F. Epidemiology and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. **Int J Med Sci**, v. 2, n. 1, p. 50-57, 2005.

HU, K. Q. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. **J Viral Hepat**, v. 9, n. 4, p. 243-57, Jul 2002.

HUY, T. T. et al. Genotype C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups. **J Gen Virol**, v. 85, n. Pt 2, p. 283-92, Feb 2004.

HUSA, P. et al. [Diagnosis and therapy of chronic hepatitis B: Czech national guidelines]. **Klin Mikrobiol Infekc Lek**, v. 20, n. 4, p. 121-32, Dec 2014.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses - Virus Taxonomy: 2013 Release. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/index.asp>>.

Informe Técnico Institucional Rev Saúde Pública 2006;40(6):1137-40 Vacina contra hepatite B Hepatitis B vaccine Divisão de Imunização. Divisão de Hepatites. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo – DI/DH/CVE/CCD/SES-SP

KAVITA S. LOLE, VIDYA A. ARANKALLE. Quantitation of hepatitis B virus DNA by real-time PCR using internal amplification control and dual TaqMan MGB probes. **Journal of Virological Methods** 135; 83–90, 2006.

KAO, J. H. Hepatitis B viral genotypes: clinical relevance and molecular characteristics. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 17, n. 6, p. 643-50, Jun 2002.

KATSURAGAWA, T. H., et al. Alta soroprevalência dos marcadores das hepatites B e C na região do alto rio Madeira, Porto Velho, Rondônia, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**.1(2):93-8, jun 2010.

KEEFFE, E. B. et al. A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States: an update. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 4, n. 8, p. 936-62, Aug 2006.

KEW, M. C. Epidemiology of chronic hepatitis B virus infection, hepatocellular carcinoma, and hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. **Pathol Biol (Paris)**, v. 58, n. 4, p. 273-7, Aug 2010.

KIDD-LJUNGGREN, K. et al. High levels of hepatitis B virus DNA in body fluids from chronic carriers. **J Hosp Infect**, v. 64, n. 4, p. 352-7, Dec 2006.

KIM, B. K.; REVILL, P. A.; AHN, S. H. HBV genotypes: relevance to natural history, pathogenesis and treatment of chronic hepatitis B. **Antivir Ther**, v. 16, n. 8, p. 1169-86, 2011.

KOSHY, R.; HOFSCHEIDER, P. H. Transactivation by hepatitis B virus may contribute to hepatocarcinogenesis. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 144, p. 265-81, 1989.

KRAMVIS, A. et al. Analysis of the complete genome of subgroup A' hepatitis B virus isolates from South Africa. **J Gen Virol**, v. 83, n. Pt 4, p. 835-9, Apr 2002.

LAU, G. K.; LEE, C. K.; LIANG, R. Hepatitis B virus infection and bone marrow transplantation. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 31, n. 1, p. 71-6, Jun 1999.

LAVANCHY, D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. **J Viral Hepat**, v. 11, n. 2, p. 97-107, Mar 2004.

LEVINE, S. et al. Efficacies of entecavir against lamivudine-resistant hepatitis B virus replication and recombinant polymerases in vitro. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 8, p. 2525-32, Aug 2002.

LEVRERO, M. et al. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. **J Hepatol**, v. 51, n. 3, p. 581-92, Sep 2009.

LEVAST, M. et al. Prevalence and impact of occult hepatitis B infection in chronic hepatitis C patients treated with pegylated interferon and ribavirin. **J Med Virol**, v. 82, n. 5, p. 747-54, May 2010.

LIBERATO MIM, OLIVEIRA BCEPD, CABRAL MC. Hepatits Virais. In: Santos NOS. **Introdução a Virologia Humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p.135-144, 2002.

LIN, C. L.; KAO, J. H. Hepatitis B virus genotypes and variants. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 5, n. 5, p. a021436, May 2015.

LIU, C. J. et al. Transmission of occult hepatitis B virus by transfusion to adult and pediatric recipients in Taiwan. **J Hepatol**, v. 44, n. 1, p. 39-46, Jan 2006.

LIU, Y. et al. A genotype-independent real-time PCR assay for quantification of hepatitis B virus DNA. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 2, p. 553-8, Feb 2007.

LOK, A. S. et al. Evolution of hepatitis B virus polymerase gene mutations in hepatitis B e antigen-negative patients receiving lamivudine therapy. **Hepatology**, v. 32, n. 5, p. 1145-53, Nov 2000.

LOK, A. S.; MCMAHON, B. J. Chronic hepatitis B. **Hepatology**, v. 34, n. 6, p. 1225-41, Dec 2001.

_____. Chronic hepatitis B. **Hepatology**, v. 45, n. 2, p. 507-39, Feb 2007.

_____. Chronic hepatitis B: update 2009. **Hepatology**, v. 50, n. 3, p. 661-2, Sep 2009.

LUCIFORA, J. et al. Control of hepatitis B virus replication by innate response of HepaRG cells. **Hepatology**, v. 51, n. 1, p. 63-72, Jan 2010.

MACCALLUM, F. O. Homologous Serum Hepatitis. **Proc R Soc Med**, v. 39, n. 10, p. 655-7, Aug 1946.

MAHONEY, F. J. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. **Clin Microbiol Rev**, v. 12, n. 2, p. 351-66, Apr 1999.

MARCELLIN, P. et al. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. **N Engl J Med**, v. 348, n. 9, p. 808-16, Feb 27 2003.

MENDES, Claudio G. Figueiredo. Hepatites Agudas. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, UERJ, v. 5, p. 09–15, 2006.

MINUK, G. Y. et al. Occult hepatitis B virus infection in a North American community-based population. **J Hepatol**, v. 42, n. 4, p. 480-5, Apr 2005.

MORAES, M. T.; GOMES, S. A.; NIEL, C. Sequence analysis of pre-S/S gene of hepatitis B virus strains of genotypes A, D, and F isolated in Brazil. **Arch Virol**, v. 141, n. 9, p. 1767-73, 1996.

MORESCO, M. N. et al. Occult hepatitis B virus infection among blood donors from the Brazilian Amazon: implications for transfusion policy. **Vox Sang**, v. 107, n. 1, p. 19-25, Jul 2014.

MUTIMER, D. Hepatitis B virus infection: resistance to antiviral agents. **J Clin Virol**, v. 21, n. 3, p. 239-42, Jun 2001.

NASSAL, M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. **Gut**, Jun 5 2015.

NASSAL, M. Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. **Virus Res**, v. 134, n. 1-2, p. 235-49, Jun 2008.

NORDER, H. et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. **Intervirology**, v. 47, n. 6, p. 289-309, 2004.

NORDER, H. et al. Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen. **J Gen Virol**, v. 74 (Pt 7), p. 1341-8, Jul 1993.

NOWAK, M. A. et al. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 9, p. 4398-402, Apr 30 1996.

OLUYINKA, O. O. et al. Occult Hepatitis B Virus Infection in Nigerian Blood Donors and Hepatitis B Virus Transmission Risks. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0131912, 2015.

OWIREDU, W. K.; KRAMVIS, A.; KEW, M. C. Molecular analysis of hepatitis B virus genomes isolated from black African patients with fulminant hepatitis B. **J Med Virol**, v. 65, n. 3, p. 485-92, Nov 2001.

PETERSEN, J.; BUTI, M. Considerations for the long-term treatment of chronic hepatitis B with nucleos(t)ide analogs. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 6, n. 6, p. 683-93; quiz 694, Dec 2012.

PIROTH, L. et al. The evolution of hepatitis B virus serological patterns and the clinical relevance of isolated antibodies to hepatitis B core antigen in HIV infected patients. **J Hepatol**, v. 36, n. 5, p. 681-6, May 2002.

PRINCE, A. M. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 60, n. 3, p. 814-21, Jul 1968.

POLLICINO, T. et al. Molecular and functional analysis of occult hepatitis B virus isolates from patients with hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 45, n. 2, p. 277-85, Feb 2007.

QUINTERO, A. et al. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Afro-Venezuelan populations. **Arch Virol**, v. 147, n. 9, p. 1829-36, Sep 2002.

RABE, B. et al. Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003.

RASTEGARVAND, N. et al. Molecular Characterization of Pre-Core/Core and S Region of Hepatitis B Virus in Hemodialysis Patients With Occult Hepatitis B Infection. **Jundishapur J Microbiol**, v. 8, n. 10, p. e23686, Oct 2015.

RAIMONDO, G. et al. Occult hepatitis B virus in liver tissue of individuals without hepatic disease. **J Hepatol**, v. 48, n. 5, p. 743-6, May 2008.

RAIMONDO, G. et al. Occult hepatitis B virus infection. **J Hepatol**, v. 46, n. 1, p. 160-70, Jan 2007.

RAIMONDO, G.; POLLICINO, T.; SQUADRITO, G. Clinical virology of hepatitis B virus infection. **J Hepatol**, v. 39 Suppl 1, p. S26-30, 2003.

RAIMONDO, G. et al. Occult HBV infection. **Semin Immunopathol**, v. 35, n. 1, p. 39-52, Jan 2013.

RAMEZANI, A. et al. Serological pattern of anti-HBc alone infers occult hepatitis B virus infection in high-risk individuals in Iran. **J Infect Dev Ctries**, v. 4, n. 10, p. 658-61, Oct 2010.

REHERMANN, B. Pathogenesis of chronic viral hepatitis: differential roles of T cells and NK cells. **Nat Med**, v. 19, n. 7, p. 859-68, Jul 2013.

RIOS-OCAMPO, W. A. et al. Occult hepatitis B virus infection among blood donors in Colombia. **Virol J**, v. 11, p. 206, 2014.

SAMAL, J.; KANDPAL, M.; VIVEKANANDAN, P. Molecular mechanisms underlying occult hepatitis B virus infection. **Clin Microbiol Rev**, v. 25, n. 1, p. 142-63, Jan 2012.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 12, p. 5463-7, Dec 1977.

SANCHEZ, L. V. et al. Difference of hepatitis B virus genotype distribution in two groups of mexican patients with different risk factors. High prevalence of genotype H and G. **Intervirol**, v. 50, n. 1, p. 9-15, 2007.

SARMAST SHOOSHTARI, M. H. et al. Evaluation of hepatitis B surface antibody and specific gamma interferon response in health care workers after vaccination. **Jundishapur J Microbiol**, v. 8, n. 1, p. e13801, Jan 2015.

SANTOS AO, BOTELHO-SOUZA LF, BORZACOV LM, VILLALOBOS-SALCEDO JM, VIEIRA DS: Development of cost-effective real-time PCR test: to detect a wide range of HBV DNA concentrations in the **western amazon region of Brazil**. **Virology journal**, **11(1):16**, 2014.

SANTOS, E. A. et al. Frequent occult hepatitis B virus infection in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 22, n. 2, p. 92-8, Feb 2003.

SANTOS, A. O. et al. Characterization of hepatitis B virus (HBV) genotypes in patients from Rondonia, Brazil. **Virol J**, v. 7, p. 315, 2010.

SEEGER, C.; MASON, W. S. Hepatitis B virus biology. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 64, n. 1, p. 51-68, Mar 2000.

SHAFRITZ, D. A. et al. Monoclonal radioimmunoassays for hepatitis B surface antigen: demonstration of hepatitis B virus DNA or related sequences in serum and viral epitopes in immune complexes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 79, n. 18, p. 5675-9, Sep 1982.

SHEPHERD, J. et al. Adefovir dipivoxil and pegylated interferon alfa-2a for the treatment of chronic hepatitis B: a systematic review and economic evaluation. **Health Technol Assess**, v. 10, n. 28, p. iii-iv, xi-xiv, 1-183, Aug 2006.

SHIRE, N. J. et al. Occult hepatitis B in HIV-infected patients. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 36, n. 3, p. 869-75, Jul 1 2004.

SHIRE, N. J. et al. The prevalence and significance of occult hepatitis B virus in a prospective cohort of HIV-infected patients. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 44, n. 3, p. 309-14, Mar 1 2007.

SILVA A. C. B, et al. Perfil soropidemiológico da hepatite B em localidades ribeirinhas do rio Madeira, em Porto Velho, Estado de Rondônia, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, 6(2):51-59, 2015.

SITNIK, R. et al. Hepatitis B virus genotypes and precore and core mutants in Brazilian patients. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 6, p. 2455-60, Jun 2004.

SINTRA, Conferência de Consenso Sobre Hepatites B e C, 2003.

SUREAU, C.; SALISSE, J. A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus a-determinant. **Hepatology**, v. 57, n. 3, p. 985-94, Mar 2013.

SQUADRITO, G. et al. Impact of occult hepatitis B virus infection on the outcome of chronic hepatitis C. **J Hepatol**, v. 59, n. 4, p. 696-700, Oct 2013.

STRAMER, S. L. et al. Nucleic acid testing to detect HBV infection in blood donors. **N Engl J Med**, v. 364, n. 3, p. 236-47, Jan 20 2011.

STUYVER, L. et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. **J Gen Virol**, v. 81, n. Pt 1, p. 67-74, Jan 2000.

SUGAUCHI, F. et al. Hepatitis B virus genotypes and clinical manifestation among hepatitis B carriers in Thailand. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 17, n. 6, p. 671-6, Jun 2002.

PARASKEVIS, D. et al. Development and assessment of a novel real-time PCR assay for quantitation of HBV DNA. **J Virol Methods**, v. 103, n. 2, p. 201-12, May 16 2002.

PARASKEVIS, D. et al. Development of a new ultra sensitive real-time PCR assay (ultra sensitive RTQ-PCR) for the quantification of HBV-DNA. **Virol J**, v. 7, p. 57, 2010.

PINHO JRR. Diagnóstico contemporâneo da hepatite B oculta ou críptica. *einstein*. Suppl 1: 32-8, 2005.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v. 14, n. 9, p. 817-8, 1998.

TANG, C. M.; YAU, T. O.; YU, J. Management of chronic hepatitis B infection: current treatment guidelines, challenges, and new developments. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 20, p. 6262-78, May 28 2014.

TENGAN FM e ARAÚJO ESA. Epidemiologia da hepatite B e D e seu impacto no sistema de saúde. **Braz J Infect Dis** 10(1): 6-10, 2006.

TELES, S. A. et al. Hepatitis B virus transmission in Brazilian hemodialysis units: serological and molecular follow-up. **J Med Virol**, v. 68, n. 1, p. 41-9, Sep 2002.

THIMME, R. et al. CD8+ T Cells Mediate Viral Clearance and Disease Pathogenesis during Acute Hepatitis B Virus Infection. **Journal of Virology**, v. 77, n. 1, p. 68-76, jan. 2003.

THOMPSON, J. D. et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res**, v. 25, n. 24, p. 4876-82, Dec 15 1997.

TORBENSON, M.; THOMAS, D. L. Occult hepatitis B. **Lancet Infect Dis**, v. 2, n. 8, p. 479-86, Aug 2002.

WAI, C. T. et al. HBV genotype B is associated with better response to interferon therapy in HBeAg(+) chronic hepatitis than genotype C. **Hepatology**, v. 36, n. 6, p. 1425-30, Dec 2002.

WEBER, B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. **J Clin Virol**, v. 32, n. 2, p. 102-12, Feb 2005.

WEBER, B. et al. Hepatitis B virus markers in anti-HBc only positive individuals. **J Med Virol**, v. 64, n. 3, p. 312-9, Jul 2001.

WHO- World Health Organization: Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int>> Acesso em: 22 de out. 2015.

WAN, M.; DOU, X. [Interpretations of diagnosis and management of chronic hepatitis B in children, young people and adults by NICE (2013)]. **Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi**, v. 22, n. 8, p. 561-6, Aug 2014.

WIELAND, S. F.; CHISARI, F. V. Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses. **J Virol**, v. 79, n. 15, p. 9369-80, Aug 2005.

WONG, D. K. et al. Occult hepatitis B infection and HBV replicative activity in patients with cryptogenic cause of hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 54, n. 3, p. 829-36, Sep 2 2011.

WHERRY, E. J. et al. Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 45, p. 16004-9, Nov 9 2004.

YAN, H. et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. **Elife**, v. 1, p. e00049, 2012.

YAN, H. et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. **Elife**, v. 3, 2014.

YIM, H. J.; LOK, A. S. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. **Hepatology**, v. 43, n. 2 Suppl 1, p. S173-81, Feb 2006.

ZERBINI, A. et al. The characteristics of the cell-mediated immune response identify different profiles of occult hepatitis B virus infection. **Gastroenterology**, v. 134, n. 5, p. 1470-81, May 2008.

ZHANG, X. et al. Analysis of hepatitis B virus genotypes and pre-core region variability during interferon treatment of HBe antigen negative chronic hepatitis B. **J Med Virol**, v. 48, n. 1, p. 8-16, Jan 1996.

ZOBEIRI, M. Occult hepatitis B: clinical viewpoint and management. **Hepat Res Treat**, v. 2013, p. 259148, 2013.